

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-542791

(P2002-542791A)

(43) 公表日 平成14年12月17日 (2002. 12. 17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	特許出願公表番号
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		C 1 2 Q 1/25	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/25		5/00	B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁)

(21) 出願番号 特願2000-614410(P2000-614410)
 (86) (22) 出願日 平成12年4月26日 (2000. 4. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年10月25日 (2001. 10. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP 00/03765
 (87) 国際公開番号 WO 00/65076
 (87) 国際公開日 平成12年11月2日 (2000. 11. 2)
 (31) 優先権主張番号 99201306. 0
 (32) 優先日 平成11年4月26日 (1999. 4. 26)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (E P)
 (31) 優先権主張番号 00200171. 7
 (32) 優先日 平成12年1月18日 (2000. 1. 18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (E P)

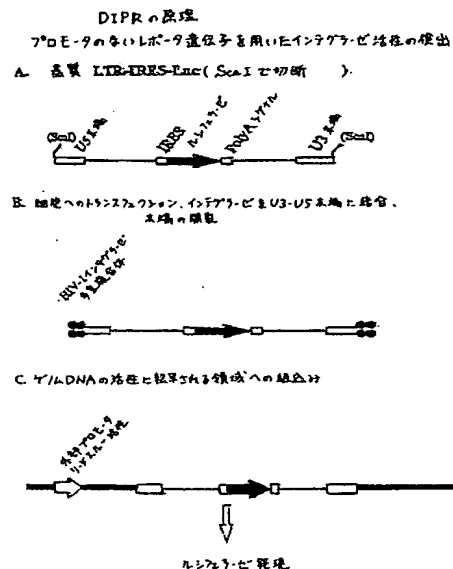
(71) 出願人 カー・イユー・ルーベン・リサーチ・アンド・ディベロップメント
 K. U. Leuven Research & Development
 ベルギー、ペー-3000ルーベン、ベネデン
 ストラート59番、グロート・ベジェインホフ
 (72) 発明者 デビゼル, ツェーゲル
 ベルギー、ペー-3001 ヘベルリー、コル
 ビークローゼシュトラート、108
 (74) 代理人 弁理士 深見 久郎 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真核生物中で活性を有するレトロウィルスタンパク質を発現させるための合成遺伝子

(57) 【要約】

この発明は、野生型遺伝子に比べて改善されたコドン使用頻度を有する、真核細胞におけるレトロウィルスタンパク質の高レベル発現のための合成遺伝子または遺伝子の領域であって、発現された該レトロウィルスタンパク質は真核細胞中で酵素活性を有することを特徴とする。加えてこの発明は、哺乳動物またはその他の真核細胞において通常発現されるレトロウィルス酵素またはレトロウィルス酵素の一部をコードする合成遺伝子または遺伝子の領域であって、その酵素をコードする野生型遺伝子における少なくとも1つの好ましくないコドンが同じアミノ酸をコードする好ましいコドンによって置換されていることを特徴とする。レトロウィルスタンパク質はプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼタンパク質、またはそのポリタンパク質 g a g - p o l 前駆体であってもよい。実施例の1つにおいて、酵素活性を有するレトロウィルスタンパク質はレンチウィルスタンパク質である。別の実施例において、酵素活性を有するタンパク質は p o l 酵素である。より好ましい実施例において、酵素活性を有するタンパク質はレンチウィルスインテグ



【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロモータのないレポータ遺伝子を用いた細胞内インテグラーゼ活性の検出方法。

【請求項2】 レポータ遺伝子はルシフェラーゼ、GFPまたは抗生物質選択マーカーであってもよい、請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】 レポータ遺伝子構造はレポータ遺伝子から生成され、前記構造は請求項17から26のいずれかに記載の合成遺伝子から発現される酵素活性を有するレトロウィルスタンパク質の基質として用いられる、請求項1または2に記載の検出方法。

【請求項4】 合成gagまたはpol遺伝子に基づくレンチウィルスまたは複合レトロウィルスベクターに対するパッケージング構造。

【請求項5】 合成遺伝子は請求項17から26のいずれかに記載の合成遺伝子である、請求項4に記載のパッケージング構造。

【請求項6】 請求項27から29のいずれかに記載の発現ベクターを用いた真核細胞のトランスフェクション法。

【請求項7】 請求項17から26のいずれかに記載の合成遺伝子または遺伝子の領域を保持する真核細胞系。

【請求項8】 レトロウィルスの酵素活性を有するタンパク質が構成的、誘導性または組織特異的プロモータを用いて発現される、請求項7に記載の真核細胞系。

【請求項9】 前記発現は安定である、請求項7または8に記載の真核細胞系。

【請求項10】 請求項17から26のいずれかに記載の合成遺伝子または遺伝子の領域を保持する、ヒト以外のトランスジェニック動物。

【請求項11】 合成遺伝子または遺伝子の領域の発現は誘導性プロモータまたは組織特異的プロモータによって誘導される、請求項10に記載のトランスジェニック動物。

【請求項12】 前記動物は哺乳動物である、請求項10または11に記載のトランスジェニック動物。

【請求項13】 標的真核細胞において酵素活性を有するレトロウィルスタンパク質またはこうしたタンパク質の一部をコードする合成遺伝子または遺伝子の領域を調製する方法であって、

1) 標的細胞において容易におよび／または高濃度で自然に発現されるタンパク質をコードする標的真核細胞の遺伝子全体の組からの遺伝子の群を識別するステップと、

2) 前記識別された遺伝子のコドン配列を定め、前記配列から好ましいコドン使用頻度および好ましいヌクレオチド対頻度を定めるステップと、

3) 前記好ましいコドン使用頻度を用いて、酵素活性を有するタンパク質をコードする自然の遺伝子における好ましくないコドンを識別するステップと、

4) 1つまたはそれ以上の好ましくないコドンを、置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする1つまたはそれ以上の好ましいコドンによって置換し、前記置換を偏らせて好ましいヌクレオチド対頻度を得るステップとを含む、方法。

【請求項14】 前記置換するステップは、乱数発生器を用いて各位置における同じアミノ酸をコードする代替的なコドンからのランダムな選択に基づいて行なわれ、好ましいコドン使用頻度に基づいて代替的なコドンの選択を偏らせることによって好ましいヌクレオチド対頻度を得る、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 請求項17から26のいずれかに記載の合成遺伝子または遺伝子の領域を発現する真核細胞における遺伝子導入方法。

【請求項16】 合成遺伝子は一過的に発現されるか、または前記細胞中に安定に組込まれる、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 真核細胞中でレトロウィルスgagまたはpolタンパク質を発現させるための、合成レトロウィルスgagもしくはpol遺伝子またはレトロウィルスgagもしくはpol遺伝子の領域であって、発現されるレトロウィルスタンパク質の発現レベルは、真核細胞中で発現されるレトロウィルスタンパク質の野生型機能の検出可能な活性を与えるレベルである、合成遺伝子または遺伝子の領域。

【請求項18】 レトロウィルス遺伝子は真核細胞に適用した場合には好ましくないコドンを有し、好ましくないコドンの数は、真核細胞に関して好ましく

ないコドンのすべてを好ましいコドンによって置換することによってGCヌクレオチド対の含有量が65%以上になるものであり、合成遺伝子のGCヌクレオチド対の含有量は53%から63%、より好ましくは55%から61%であり、発現されるレトロウィルスタンパク質は、真核細胞中で発現されるレトロウィルスタンパク質の検出可能な酵素活性を与えるレベルで発現される、請求項17に記載の合成遺伝子。

【請求項19】 gagまたはpolタンパク質の発現はレトロウィルス調節タンパク質に依存しない、請求項17または18に記載の合成遺伝子。

【請求項20】 レトロウィルスタンパク質はレンチウィルスgagまたはpolタンパク質である、請求項17から19のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項21】 レンチウィルスタンパク質はHIVgagまたはpolタンパク質である、請求項20に記載の合成遺伝子。

【請求項22】 酵素機能の検出可能な活性は、宿主細胞DNA、好ましくは宿主細胞の染色体へのDNAフラグメントの組み込みの少なくとも促進または刺激を含む、請求項18から21のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項23】 レトロウィルスタンパク質はプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼタンパク質、またはそのポリタンパク質gag-pol前駆体である、請求項17から22のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項24】 前記真核細胞は哺乳動物細胞である、請求項17から23のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項25】 前記タンパク質の発現は、真核細胞における野生型遺伝子による発現の少なくとも200%のレベルである、請求項17から24のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項26】 図2Aの配列、またはGC含有量が53%から63%、好ましくは55%から61%であるその相同体を含む、請求項17から25のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項27】 請求項17から26のいずれかに記載の合成遺伝子または遺伝子の領域を含む真核生物発現ベクター。

【請求項28】 構成的または誘導性または組織特異的プロモータをさらに

含む、請求項27に記載の発現ベクター。

【請求項29】 プラスミド、哺乳動物または昆虫ウィルスを含む、請求項27または28に記載の発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

この発明は、真核細胞、特に哺乳動物細胞においてレトロウイルスタンパク質を発現させるための合成遺伝子の設計と、合成遺伝子と、その遺伝子を含む発現ベクターと、その遺伝子を安定に保持する真核細胞と、検出方法とに関する。

【0002】

【技術背景】

レトロウイルスは二倍体のプラス鎖RNAウイルスであり、組込まれたDNA中間体を通じて複製する。レトロウイルスは典型的に、ウイルスゲノムを有するタンパク質被包性のコアを囲むタンパク質含有脂質エンベロープを含む。感染した細胞内で、レトロウイルスゲノムはレトロウイルス粒子の一部であるウイルスにコードされた逆転写酵素によって二本鎖DNAに逆転写される。この粒子はインテグラーゼなどの他の酵素も含む。インテグラーゼはウイルスにコードされる酵素で、ウイルスのDNAコピーを宿主細胞の染色体に挿入するレトロウイルス組込みと呼ばれるプロセスを起こす。(概説のためにはブラウン(1997年)の「レトロウイルス」(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、USA) pp. 161-203を参照)。AIDSの原因となる病原体のヒト免疫不全症ウイルスタイプ1(HIV-1)の複製サイクルにおいて、組込みは必須のステップである(ラフェミナ(LaFemina)ら(1992), J. Virol. 66: 7414-7419)。ヒトの対応物の存在は知られていないため、組込みは新たな抗ウイルス標的の可能性があると多くの注目を集めている。しかし、インテグラーゼ阻害剤の開発は、関連する細胞組込みアッセイがないという問題を有する。すなわち、インテグラーゼ活性は典型的に人工オリゴヌクレオチドに基づく試験管反応を用いて評価される。したがって、細胞内組込みアッセイを提供することが必要とされている。

【0003】

野生型レトロウイルスゲノムは、gag、polおよびenv遺伝子として公知の少なくとも3つの遺伝子を含む。gag遺伝子は内部コア構造タンパク質をコードし、pol遺伝子はプロテアーゼ、逆転写酵素およびインテグラーゼなど

の特定の酵素をコードし、env遺伝子はレトロウイルスのエンベロープ糖タンパク質をコードする。異なるレトロウイルスのインテグラーゼは30 kDaから46 kDaの大きさのばらつきがあり、これはpol遺伝子の3'末端によってコードされ、gag-polポリタンパク質前駆体からタンパク質分解プロセッシングによって放出される。インテグラーゼのアミノ末端ドメインはジンクフィンガー(HHCC)によって特徴付けられ、これはすべてのレトロウイルスにおいて普遍的に保存されており、in vivo組込みのために必須である。この特定のドメインは、触媒作用に関与する必須のDD35Eモチーフとともに最もよく保存された領域である。この部分はin vitroで分解反応を触媒できる。カルボキシ末端ドメインはDNA結合ドメインと呼ばれ、最も低い配列保存を示す。このフラグメントは3'末端プロセッシングおよび組込みのために必要とされる。活性の酵素は多量体として存在し、そこで活性ドメインは不活性ドメインをトランス相補できると考えられている。

【0004】

過去に、COS細胞におけるトリ肉腫白血病ウイルス(ASLV)インテグラーゼの一過性発現が得られた(モリスーバシオス(Morris-Vasios)ら(1988), J. Virol. 62: 349-353)。ラウス肉腫ウイルス(RSV)のインテグラーゼを安定に発現するマウス細胞系も報告されている(マム(Mumm)ら(1992), Virology 189: 500-510)。発現レベルは明記されていないが、比較的低かったようである。HIV-1のインテグラーゼ(IN)は、大腸菌(E. coli)(シャーマンおよびファイフ(Fyfe)(1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5119-5123)、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞(ブッシュマンら(1991), Science 294: 1555-1558)、およびサッカロミセスセレビシエ(コーモント(Caumont)ら(1996), Curr. Genet. 29: 503-510)において発現された。酵母において、インテグラーゼ発現はDNA修復が不完全な細胞中で有害であることが明らかになった。哺乳動物細胞におけるHIV-1インテグラーゼの高レベル発現は未だに実現しにくく、その理由の大部分は、一般的にHIV-1のgagおよびpolタンパク質の発現がRev依存性であるためである(カレン(Cullen)(1992), Microb. Rev. 56: 375-395)。哺乳動物細胞においては、HIV-INまた

は β -ガラクトシダーゼもしくはGFPに融合させたHIV-1のRev依存性の発現が過去に報告されている(ファウストラ(1995), Biochem. Mol. Biol. Int. 36: 745-758; クコルジ(Kukolj)ら(1997), J. Virol. 71: 843-847; プリュイメルスら(1999), Virology 258: 327-332)。しかし、一過性トランスフェクションの後においても発現レベルは常に低かった。Rev不在下では、mRNA中のシス作用性リプレッサー配列(CRS)とも呼ばれる複数の阻害または不安定性配列(INS)がタンパク質発現を妨げる。可能性のあるメカニズムには、核残留またはmRNAの不安定性が含まれる。CRSを含むmRNAは核内にトラッピングされ、発現の阻害は少なくとも部分的にはmRNAのサイトソルへの転移が少ないためであることが観察された(ミカエリアンら(1996), J. Mol. Biol. 257: 246-264; ボルグラ(1997), Virology 236: 95-103)。RNAプロセッシング機構の要素がCRSを含むmRNAの核トラッピングに関与し得る。さらに、mRNAの不安定性に寄与するHIV-1ゲノムのいくつかの領域はAU含有量が高いという証拠がある。それらはmRNAの不安定性に寄与する細胞因子に対する結合部位を表わしているのかもしれない(シュナイダーら(1997), J. Virol. 71: 4892-4903)。別の仮説に従うと、阻害配列を含むmRNAはRevなしでは効率的に翻訳されない。観察される阻害のメカニズムが何であれ、その阻害が特定のレベルのmRNAによって引き起こされ、いくつかのAUリッチな領域によるものであることは明らかである。HIV複製サイクルにおいては、RevがRev応答配列(RRE)と相互作用することによって制御される状態で阻害が軽減される(シュワルツら(1992), J. Virol. 66: 150-159)。この観点から、gag-pol転写産物に対するコード機能を保存しながらいくつかのINSを変異させることによってウイルス粒子の効率的なRev非依存性発現が得られたことは驚くに値しない(シュナイダーら(1997), J. Virol. 71: 4892-4903)。HIV gp120のmRNAの場合には、mRNAの不安定性ではなく非効率的なコドン使用頻度による翻訳能の低さが低レベルタンパク質発現の原因であることが証明されている(ハースら, 1996; シュナイダーら(1997), J. Virol. 71: 4892-4903)。

【 0 0 0 5 】

US 5, 811, 270号(グランドジェネット(Grandgenett))に記載される協調組込みの分析の試験管法においては、まずウイルスインテグラーゼ酵素が供与体DNA分子とともにインキュベートされ、その後標的DNA分子とともにインキュベートされる。協調組込み生成物の分析のために、供与体DNAは少なくとも1つの一意の制限酵素切断部位を有する。この記載される方法は、HIV-1またはHIV-2インテグラーゼ阻害剤のスクリーニングなどのインテグラーゼの研究、ならびにヒト以外のトランスジェニック動物の生成および遺伝子転移のために有用だといわれている。用いられるインテグラーゼはウイルス粒子から精製され、その活性は細胞内ではなく試験管中で分析される。

【0006】

US 5, 795, 737号、WO 96/09378号、WO 97/11086号、およびWO 98/12207号はすべて哺乳動物細胞中で通常発現されるタンパク質をコードする合成遺伝子を生成する方法を記載しており、この方法によって合成遺伝子は哺乳動物細胞中でコードされたタンパク質を過剰発現することが報告されている。この公知の合成遺伝子は、遺伝子コードの重複を用いることにより、好ましくないコドンまたはあまり好ましくないコドンを同じアミノ酸をコードする好ましいコドンによって置換することによって構築される。エンベロープ糖タンパク質をコードする合成env遺伝子の例が示されているが、宿主細胞中で酵素活性を有するタンパク質の発現については考察されていない。タンパク質の酵素活性を維持しながらそれを過剰発現させるための合成遺伝子を設計する方法を公知の教示から導くことはできない。細胞内での酵素活性を示せない(レトロウイルス)タンパク質を発現させ得る多数の因子が存在する。発現される酵素は多くの理由によって不完全になるおそれがあり、そのうち酵素の細胞内での阻害および同時に別のウイルスタンパク質が存在することの必要性などはわずかである。さらに、ある酵素を過剰発現できるかどうかは明らかではなく、たとえば溶解性の低さまたは細胞毒性などのいくつかの制限的な要素が存在するおそれがある。一方では酵素活性を検出するためにレトロウイルス酵素の高レベル発現が必要とされ、他方ではその高すぎるレベルのためにタンパク質の沈殿または細胞毒性がもたらされるおそれがある。あらゆるレトロウイルス酵素が細胞中で

活性であるためには適切な細胞内濃度が必要とされる。失敗した場合には、好ましくないコドンを実定の割合、たとえば90%、80%、70%...まで置換することが提案されるが、どのコドンを置換すべきかをいかに選択するかという正確な教示はない。特に、ある特定のヌクレオチド対の頻度が高レベルの遺伝子発現に関連することは示されていない。(envにおける) RRE不安定性のメカニズムが、gagおよびpolにおけるmRNAの不安定性の問題と同じであるか、またはそれに関連していることさえ決定的ではない。実はそのメカニズムは異なるという証拠がある。したがって、env遺伝子のRev非依存的発現に基づいてgagおよびpol遺伝子の不安定性の問題を直せるかどうかは予測できない。

【0007】

この発明の目的は、真核細胞、特に哺乳動物細胞における酵素活性を有するレトロウイルスタンパク質、特にHIV-1インテグラーゼに対する有効な発現システムを開発することである。

【0008】

この発明のさらなる目的は、レトロウイルス酵素阻害剤に対するより効率的な検出方法を提供することである。

【0009】

この発明のさらなる目的は、酵素活性を有するレトロウイルスタンパク質をコードする遺伝子の構築のための設計方法を提供することである。

【0010】

この発明のさらなる目的は、遺伝子がコードする酵素活性を有するタンパク質を細胞中で発現させるために標的細胞に遺伝子を運び得る発現ベクターを提供することである。

【0011】

【発明の概要】

この発明は、野生型遺伝子に比べて改善されたコドン使用頻度を有する、真核細胞におけるレトロウイルスタンパク質の高レベル発現のための合成遺伝子または遺伝子の領域であって、発現されたレトロウイルスタンパク質は真核細胞中で

酵素活性を有することを特徴とする。加えてこの発明は、哺乳動物またはその他の真核細胞において通常発現されるレトロウイルス酵素またはレトロウイルス酵素の一部をコードする合成遺伝子または遺伝子の領域であって、その酵素をコードする野生型遺伝子における少なくとも1つの好ましくないコドンが同じアミノ酸をコードする好ましいコドンによって置換されていることを特徴とする。「改善されたコドン使用頻度を有する遺伝子の領域」とは、遺伝子の転写された mRNA において通常不安定性配列 (INS) またはシス作用性リプレッサ配列 (CRS) を生成する遺伝子の部分においてのみコドンを変更することが十分であり得ることを意味する。

【 0 0 1 2 】

「哺乳動物または真核細胞において通常発現されるレトロウイルスタンパク質または酵素」とは、疾患条件下で哺乳動物または真核細胞中で発現されるタンパク質または酵素を意味する。これらは感染後に哺乳動物または真核細胞中で発現される、(レンチウイルスを含む) レトロウイルスによってコードされる遺伝子である。

【 0 0 1 3 】

好ましい実施例において、合成遺伝子は哺乳動物または真核細胞培養システムにおいて、「自然の」(または「天然の」) 遺伝子によって発現されるレベルの少なくとも 200% のレベルのレトロウイルス酵素を発現できる。

【 0 0 1 4 】

レトロウイルスタンパク質はプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼタンパク質、またはそのポリタンパク質 gag-pol 前駆体であってもよい。実施例の1つにおいて、酵素活性を有するレトロウイルスタンパク質はレンチウイルスタンパク質である。別の実施例において、酵素活性を有するタンパク質は pol 酵素である。より好ましい実施例においては、酵素活性を有するタンパク質はレンチウイルスインテグラーゼである。さらに好ましい実施例においては、その酵素は HIV 酵素である。より好ましい実施例においては、酵素活性を有するタンパク質は HIV インテグラーゼである。酵素活性は少なくとも組込み機能を含み、すなわち宿主細胞 DNA、好ましくは宿主細胞の染色体への DNA フラグメ

ントの組み込みの促進または刺激を含む。ここでのインテグラーゼは単独で、すなわちいかなるレトロウイルス成分にも依存せずに単一の成分として発現される。

【 0 0 1 5 】

「レトロウイルス成分」とは、T a t、R e v、N e f、V p u、V i f、V p r など、レトロウイルス、特定的にはレンチウイルス、より特定的にはH I V - 1 の調節および補助タンパク質を意味する。

【 0 0 1 6 】

この発明はまた、合成遺伝子または遺伝子の領域を含む真核生物発現ベクターであることを特徴とする。この発現ベクターは構成的または誘導性または組織特異的プロモータを含むことが好ましい。あらゆる好適な、たとえば確立されたトランスフェクション手順による真核細胞へのベクターのトランスフェクションの後、真核生物発現ベクターからの発現は一過性であってもよい。ベクターはプラスミド、哺乳動物または昆虫ウイルスなど、あらゆる好適なベクターであってもよい。発現ベクターを安定に保持する真核細胞系において、発現は永続的であってもよい。発現ベクターは、遺伝子導入のためのレトロウイルス粒子を生成するためのパッケージング構造に含まれていてもよい。レトロウイルス粒子はレンチウイルス粒子であってもよい。

【 0 0 1 7 】

この発明の別の局面は、合成遺伝子または遺伝子の領域を保持する真核細胞系であることを特徴とする。この細胞系は、構成的、誘導性または組織特異的プロモータを用いてレトロウイルスの酵素活性を有するタンパク質を発現することが好ましい。発現されるレトロウイルスタンパク質は、たとえば酵素欠損ウイルスの相補性によって、またはインテグラーゼの場合には別のDNA分子、好ましくは細胞の染色体へのDNA分子の挿入の刺激または促進によって測定可能な酵素活性を示す。

【 0 0 1 8 】

またこの発明は、合成遺伝子または遺伝子の領域を保持するヒト以外のトランスジェニック動物を含む。この遺伝子または遺伝子の領域の発現は、誘導性プロモータを用いて、または代替的には所望の組織において組織特異的プロモータを

用いて、あらゆるときに誘導されてもよい。

【 0 0 1 9 】

この発明はまた、酵素活性を有するレトロウイルスタンパク質またはこうしたタンパク質の一部をコードする合成遺伝子または遺伝子の領域を調製するための方法の特徴とする。この方法は好ましいコドン使用頻度を識別して用いるだけでなく、同時に、およびさらには主に、発現中の mRNA の安定性を増加させることを目的とする。この方法は、標的細胞において容易におよび／または高濃度で自然に発現されるタンパク質をコードする標的真核細胞の遺伝子全体の組からの遺伝子の小群を識別するステップを含む。この小群は 10 個以下の遺伝子、より典型的には 5 個以下の遺伝子を含んでもよい。これらの識別された遺伝子のコドン配列から、好ましいコドン使用頻度および好ましいヌクレオチド関係またはヌクレオチド対頻度が識別される。好ましいコドン使用頻度とは、遺伝子の選択群における好ましいコドンの高使用頻度に基づいて、特定のアミノ酸に対してそのアミノ酸をコードするための特定のコドンを好ましいコドンとして選択することを意味する。好ましいコドン関係とは、標的真核細胞の遺伝子において一般的にみられるさまざまなヌクレオチドの割合およびヌクレオチド同士の組合せを意味する。特定のヌクレオチド関係の 1 つは GC 含有量または GC ヌクレオチド対頻度である。好ましいコドン使用頻度を用いて、酵素をコードする自然の遺伝子における好ましくないコドンを識別し、1 つまたはそれ以上の好ましくないコドンを、置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする好ましいコドンによって置換する。この置換を偏らせることによって好ましいヌクレオチド関係またはヌクレオチド対頻度が得られ、その結果好ましいコドン使用頻度のみの使用に比べてさらによく最適化された、真核生物における発現のための条件が得られる。この置換は乱数発生器を用いて各位置における同じアミノ酸をコードする代替的なコドンからのランダムな選択に基づいて行なわれてもよく、好ましいコドン使用頻度に基づいて代替的なコドンの選択を偏らせることによって好ましいヌクレオチド関係またはヌクレオチド対頻度を得てもよい。加えて、全体のヌクレオチド関係またはヌクレオチド対頻度を好ましいものに近づけておきながら、たとえば GC 含有量およびコドン使用頻度を好ましいものに近づけておきながら、潜在的

スプライシング部位を除去し、CpGメチル化部位の数を減少させて合成遺伝子配列を編集してもよい。GC含有量は標的細胞における好ましい使用頻度に近づけておく必要があり、それはたとえば哺乳動物細胞においては約60%である。好ましいGC含有量の範囲は、ヒト細胞における遺伝子発現に対しては53%から63%、より好ましくは55%から61%である。効率的な翻訳開始を与えるためにコザックコンセンサス配列(ANNATGG)が加えられてもよい。

【0020】

すべての好ましくないコドン为好ましいコドンに置換する必要はない。好ましくないコドンを部分的に好ましいコドンに置換するだけでも発現の増加を達成し得る。いくつかの状況下では、中間レベルの発現を得るために好ましくないコドンの一部のみを好ましいコドンに置換することが望ましいかもしれない。

【0021】

「合成遺伝子」とは、自然に生じるコドンの一部を別のコドンによって置換した、自然に生じるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を意味する。たとえば、好ましくないコドンは同じアミノ酸をコードする好ましいコドンによって置換される。しかし、コドンを置換して合成遺伝子を作成することにより、たとえば哺乳動物細胞(特にヒト細胞)などの真核細胞における(真核生物、哺乳動物、原核生物またはウイルス由来の)多様な遺伝子の発現が、自然に生じる遺伝子の発現に比べて増加し得る。したがってこの発明は、ここに記載するコドン置換法による、あらゆるソースからの遺伝子の真核細胞特に哺乳動物細胞における発現の改善を含む。

【0022】

「ベクター」とは、DNAのフラグメントをその中に挿入またはクローニング可能な、たとえばプラスミドまたは哺乳動物もしくは昆虫ウイルス由来のDNA分子を意味する。ベクターは1つまたはそれ以上の一意の制限酵素切断部位を含み、定められた宿主または媒介組織において自律的に複製できることによってクローニングされた配列を再生できてよい。よって「発現ベクター」とは、タンパク質の合成を指示できるあらゆる自律的要素を意味する。このようなDNA発現ベクターは哺乳動物のプラスミドおよびウイルスを含む。

【 0 0 2 3 】

レトロウイルスの「パッケージング構造」または「パッケージングベクター」とは、ゲノムRNAの欠けたウイルス粒子を生成するために必要なタンパク質をコードするよう構成された、プラスミドベースまたはウイルスベースのベクターまたは構造を意味する。一般的にこれはgag、polおよびenv遺伝子産物を与えることを意味する。目的のレンチウイルスパッケージング構造はgagまたはpolタンパク質のコーディング配列に対する変更を含む（すなわち合成遺伝子）ことによってレンチウイルスタンパク質の発現を増しかつ安全性を高める。バイオセーフティの理由から、パッケージング機能はしばしば2つのゲノムに分割され、その一方がgagおよびpol遺伝子を発現し、他方がenv遺伝子産物を発現する。この発明に従ったパッケージング構造においては、Rev遺伝子産物などの遺伝子発現の調節因子はもはや必要とされない。これらのパッケージング構造のバイオセーフティの増加は、これらの合成遺伝子とそれらの野生型対応物との（相同）組換えに対する危険性の低下に基づいている。

【 0 0 2 4 】

この発明はさらに、タンパク質の所望の部分をコードする遺伝子の合成部分であることを特徴とする。こうした合成遺伝子フラグメントは、タンパク質の一部のみをコードすることを除いてはこの発明の合成遺伝子と類似のものである。この遺伝子の部分は何らかの酵素活性を有する酵素の一部をコードし、たとえばそれは触媒活性を有してもよく、たとえばその合成遺伝子は酵素の触媒コアをコードしてもよく、たとえばそれは逆転写酵素の一部であってもよい。

【 0 0 2 5 】

この発明はまた、プロモータのないレポータ遺伝子を用いた細胞内インテグラーゼに対する検出方法を含む。レポータ遺伝子はルシフェラーゼ、GFPまたは抗生物質選択マーカ（たとえばネオマイシン耐性など）であってもよい。このレポータ遺伝子構造は、この発明に従ったインテグラーゼなどのレトロウイルス酵素、たとえば発現ベクターのトランスフェクション後の安定な細胞系または一過性のモードにおける合成遺伝子から発現されるインテグラーゼなどのレトロウイルス酵素の基質として用いられてもよい。

【 0 0 2 6 】

この発明は、哺乳動物細胞においてヒト免疫不全症ウイルスタイプ1 (H I V - 1) のインテグラーゼなどのレトロウイルス酵素、特にレンチウイルス酵素、またはレトロウイルス酵素の一部を効率的に発現させるための合成遺伝子ならびにそれを設計および構成する方法を提供してもよい。この合成遺伝子は、野生型インテグラーゼ遺伝子のG C含有量を40%から59%に増加させることによってm R N Aの不安定性を回避する。真核生物発現ベクターにクローニングされた合成遺伝子は、さまざまな哺乳動物細胞系においてH I V - 1インテグラーゼの効率的な発現を提供する。このタンパク質のアミノ末端は第1のメチオニル残基を除去した後の配列から予想されたとおりのものであった。組換えタンパク質の核局在性は蛍光顕微鏡検査によって証明された。H I V - 1インテグラーゼを安定に発現する293T細胞系が得られた。インテグラーゼの機能性はトランス相補実験によって証明された。インテグラーゼ遺伝子中に不活性化D 6 4 V変異を有するレンチウイルスベクター粒子が得られ、これは合成遺伝子から発現されるインテグラーゼを有する産生細胞系において相補されるときに293T細胞を安定に形質導入できた。インテグラーゼを安定に発現する細胞系に欠損ウイルス粒子を感染させるとき、インテグラーゼ機能の相補性が観察された。I R E Sの後にH I V L T R末端に隣接してレポータ遺伝子を含む直鎖状のプロモータのないD N A基質によってトランスフェクションすると、インテグラーゼを発現する細胞において再現性よくより高いレポータ信号が得られた。トランスフェクションされた細胞の継代培養においてレポータ遺伝子活性の増加は安定であったため、インテグラーゼは細胞の染色体への直鎖状D N A基質の挿入を行なったと結論付けることができる。D 6 4 V変異を含む変異合成遺伝子から発現されたインテグラーゼによるレポータ信号の増加率はかなり低くなったため、この酵素の酵素活性が必要であることが示された。この発明に従った確立された細胞組込みシステムは、組込みにおける宿主とウイルス因子との相互作用の研究、特異的なH I V組込み阻害剤の開発、および遺伝子転移システムの設計を促進する。

【 0 0 2 7 】

この発明、その利点および実施例について、添付の図面を参照しながら説明す

る。

【 0 0 2 8 】

【 例 示 的 な 実 施 例 の 説 明 】

この発明について、主に哺乳動物細胞においてH I Vインテグラーゼを過剰発現させるための合成遺伝子を参照しながら説明するが、この発明はそれに制限されるものではなく、請求項によってのみ制限される。

【 0 0 2 9 】

改善したコドン使用頻度を有する合成遺伝子を設計することによって原核生物における真核生物遺伝子の発現を最適化できることは以前から公知であった。コドン使用頻度を改善することによって真核細胞における真核生物遺伝子の発現を増加させるという概念は、示されてはいたがあまり確立されていない。バクテリアから一般的な規則はほとんど適用されないことが公知である（マクライズ（Markides）F.（1996），Microb. Rev 60: 512-538）。

【 0 0 3 0 】

インテグラーゼなどのレトロウイルス酵素は通常、感染サイクルにおいて宿主細胞の細胞質中で可溶性タンパク質として機能しない。インテグラーゼは組込み前の複合体と呼ばれる大きくて不明確な核タンパク質複合体の一部であり、そこには逆転写酵素、ヌクレオカプシド、マトリックスタンパク質、ウイルスDNAおよびその他の因子も含まれる。インテグラーゼが標的細胞の細胞質においてそれだけで酵素活性を有することは明らかでなく、たとえば活性を阻害する細胞因子またはこの環境において欠けているウイルス因子が存在するかもしれない。さらに、このように発現されたインテグラーゼが人工DNA基質（後述のD I P Rを参照）と相互作用することは明らかでない。この発明の1つの局面は、組込み前の複合体を解体して簡単なインテグラーゼ-直鎖状DNAの相互作用を得ることである。この発明の1つの実施例は、真核細胞におけるレトロウイルス酵素、特にレンチウイルス酵素、特にインテグラーゼ単独の酵素活性を検出および使用するための方法である。

【 0 0 3 1 】

最初に、I N - R R Eによってトランスフェクションされた細胞におけるR e

v の共発現が I N の発現レベルを増加させるだろうという推論に基づいて、H I V - 1 I N および I N - R R E をコードする真核生物発現ベクターが構築された。しかし、これらの発現ベクターによって一過的にトランスフェクションされたヒト細胞においては、免疫蛍光顕微鏡検査またはウェスタンブロットィング (図 1) のいずれによっても I N の発現はほとんどまたは全く検出されなかった。代替的なアプローチは、インテグラーゼ遺伝子の後にサルレトロウイルスタイプ 1 の構成的輸送配列 (C T E) を導入するステップを含んだ。再び、ブロットィングの露出時間を延長した際に発現を少しだけ検出でき、その発現量は 10×10^4 個のトランスフェクションされた細胞当たりわずか 40 ng であった。緑色蛍光タンパク質 (G F P) に対する C 末端融合体 (G F P - I N) の構築によって、哺乳動物細胞において発現された野生型 H I V - 1 インテグラーゼのより明白な発現が得られた (プリュイメルスら (1999), *Virology* 258: 327-332) 。 R e v の不在下で β -ガラクトシダーゼとの C 末端融合タンパク質としてインテグラーゼを発現させたクコルジら (1997) (*J. Virol.* 71: 843-847) に従うと、R e v の共発現は必要とされなかった。I N 遺伝子中の I N S のタンパク質発現レベルにおける影響は、G F P - I N 構造の発現レベルが親 G F P に比べて 5 倍減少したことによって例示された (プリュイメルスら (1999), *Virology* 258: 327-332) 。この発明は、内在性 m R N A の安定性が増加した H I V - 1 インテグラーゼに対する合成遺伝子に基づいている。このような合成遺伝子を用いることによって、高発現レベルと同時に相補試験によって示され得るような酵素的インテグラーゼ活性が得られる。

【 0 0 3 2 】

この発明に従うと、G C 含有量を増加させたインテグラーゼ遺伝子を合成することにより、さまざまな哺乳動物細胞系において H I V - 1 I N の高レベル発現が得られる。この酵素は H I V - 1 - 由来のベクター粒子によって保持される欠損インテグラーゼを相補し、かつ L T R フラグメントに隣接してレポータ遺伝子をコードする直鎖状 D N A 基質にトランスに作用することが示された。

【 0 0 3 3 】

合成インテグラーゼ遺伝子の設計および構築

原核生物におけるコドン使用頻度は真核生物のそれとはかなり異なるという知識に基づいて、バクテリアにおける真核生物遺伝子の発現を最適化するために過去に合成遺伝子が構築されてきた。(レンチウイルスの) HIV 遺伝子は真核細胞における高レベル発現のために最適ではない。これは mRNA の不安定性を回避するために HIV が用いるメカニズム、すなわち Rev に関係する。複製サイクルにおいて初期 mRNA 転写産物はスプライシングされ、その結果 Tat および Rev などの調節タンパク質が発現される。このサイクルの後期になってようやく Rev の蓄積および Rev-RRE 相互作用がスプライシングを阻害し、AATリッチな不安定性配列を抑制することによって、構造タンパク質および酵素タンパク質をコードするスプライシングされない転写産物が生じる。この発明に従った合成遺伝子は哺乳動物細胞におけるタンパク質発現を明らかに増加させ、これは細胞中での酵素の機能性を検出するための必要条件であるが、HIV を複製するという状況において、GC 含有量の増加した遺伝子の存在は遺伝子発現の調節のメカニズムを妨げ、ウイルスの複製に有害となる可能性がある。

【 0 0 3 4 】

この発明の実施例の 1 つに従うと、哺乳動物細胞におけるより最適化されたより効率的な発現のために合成ウイルス遺伝子が設計される。HIV-1 インテグラーゼ遺伝子の GC 含有量は 40 % であるのに対し、高発現されるヒト遺伝子の GC 含有量は平均 55 - 61 % である。したがって GC 含有量は、この発明に従った好ましいヌクレオチド関係またはヌクレオチド対頻度の 1 つの局面である。遺伝コードが縮重する性質を用い、合成遺伝子における好ましいコドン使用頻度を選択することによって、HIV インテグラーゼをコードする合成遺伝子の GC コード含有量をアミノ酸配列を変えことなく最大 66 % まで増加させることができる。しかしこの発明に従うと、このことは好ましくない。最初に、この発明に従って、たとえばヒト β -グロビン、 α -、 γ -アクチンおよび EF2 遺伝子など、良好に／強く発現するヒトゲノム全体の遺伝子の小群に見られる好ましい三量体(コドン)を優先させて、代替的なコドンの選択を偏らせた(好ましいコドン使用頻度を定める方法)。加えて、この偏りは好ましいヌクレオチド関係またはヌクレオチド対頻度に近づけるように、すなわち GC 含有量が 53 % から 6

3 %、より好ましくは55 - 61 %の範囲内になるようにした。実際には66 %よりも59 %のGC含有量が達成された。真核生物発現のためのレトロウイルス遺伝子を再設計するためのその他の規則は以下のとおりである。(i) 潜在的スプライシング部位の除去、(ii) CpGメチル化部位の数の減少、(iii) 哺乳動物mRNAの5'および3'非翻訳領域(UTR)の導入(ヒトβ-グロビンの場合)、(iv) 効率的な翻訳開始のための余分なN末端ペプチド(以下の例におけるMet-Gly)の付加。その結果、さまざまな哺乳動物細胞系における合成遺伝子からの発現レベルは自然のインテグラーゼ遺伝子からの発現レベルよりも少なくとも25倍高くなった。酵母(*Pichia pastoris*)においても効率的な発現が得られた(データは示さず)。

[0 0 3 5]

この発明の実施例の1つに従うと、ヒト細胞系におけるHIV-1インテグラーゼの高レベル発現を達成するために、ヌクレオチドコドン使用頻度を構成的に高発現されるヒト遺伝子のコドン使用頻度(「好ましいコドン使用頻度」)に適合させながらHIV-1のpNL4-3クローンからのINのアミノ酸配列を維持することによって遺伝子が提供される。人工INリーディングフレームの第1のバージョンは、乱数発生器を用いる各位置における代替的なコドンのランダムな選択に基づいており、ヒトのβ-グロビン、α-、γ-アクチンおよびEF2遺伝子に見出される好ましい三量体を優先して偏らせた。次にDNA配列を実質的に編集して潜在的スプライシング部位を除去し、CpGメチル化部位の数を減少させたが、全体のGC含有量およびコドン使用頻度は最適なもの(「好ましいヌクレオチド関係」または「ヌクレオチド対頻度」)に近づけたまま保った。合成遺伝子の最後のバージョン(図2またはSEQ ID NO: 1)は、β-グロビンmRNAからの5'および3'非翻訳領域のフラグメントを含む。この遺伝子はN末端Met-Glyジペプチドが付加された野生型HIV-1インテグラーゼをコードする。この余分なグリシンコドンは効率的な翻訳開始のために必要とされるコザックのコンセンサス配列(ANNATGG)を完成させる。合成遺伝子における全体のGC含有量は、野生型における40 %に対して59 %である。この遺伝子は段階的クローニングによって、各々約150 bpの長さの6つ

の合成DNAフラグメントから構築された。図2またはSEQ ID NO: 1に示される遺伝子のさまざまな相同体はこの発明の範囲内に含まれることが理解されるべきである。この発明に従った乱数偏向手順を再適用することによって代替的な配列が生じ、それらはすべて同じタンパク質をコードし、またすべてが類似の好ましいヌクレオチド関係またはヌクレオチド対頻度を有する。こうした合成遺伝子相同体はすべてこの発明の範囲内に含まれる。

【0036】

合成遺伝子は前述のものに対する変更を含み、合成遺伝子の以下の変更および改善はこの発明の範囲内に含まれる。たとえばリーダペプチドを置換して翻訳効率および潜在的ミリスティル化に影響を与えてもよい（たとえば、Met-Ala修正形が構築された）。5'および3'-UTRを他の哺乳動物mRNAからのUTRで置換することにより転写産物の安定性を最適化してもよい。オープンリーディングフレーム中の突然変異もこの発明の範囲内に含まれ、ここでは標準的なインテグラーゼ配列（たとえばHHCCおよびDD35E）は変更されないままであることが好ましい。たとえばF185K/F185H変異を導入することによってより可溶性のバージョンを作ることができる。その他の変異によって真核細胞における酵素の触媒活性の増加または変更を誘導してもよい。たとえばこの発明は、インテグラーゼの酵素活性を大幅に減少させることが公知であるD64V変異を有する修正形合成遺伝子を含む。他のタンパク質のドメインの遺伝情報が加えられたインテグラーゼの合成遺伝子もこの発明の範囲内に含まれる。これらのドメインは、DNA結合における配列特異性などの付加的な特性を酵素に加えることが好ましい。インテグラーゼをコードする遺伝子に特異性を与える方法の例がWO96/37626号およびUS5,811,270号に記載されているが、これらはこの発明の特定の革新的局面を記載するものではない。

【0037】

HIV-1インテグラーゼに対する合成遺伝子は、野生型インテグラーゼ遺伝子における不安定性配列（INS）によって誘導される遺伝子発現の阻害を回避するように設計された。このアプローチは一般的にレトロウィルスインテグラーゼに適用できる。特に前述の設計方法は、真核生物における効率的な発現のため

に、酵素活性を有するタンパク質をコードするあらゆるレトロウィルスのウィルス遺伝子の再設計に用いられてもよい。特にこの発明に従った合成遺伝子の設計方法は、酵素活性を有するタンパク質、特にレンチウィルスインテグラーゼおよび一般的な *p o l* タンパク質をコードするレトロウィルス遺伝子の真核生物での発現を増やす。この発明のこの特定のアプローチは、*e n v* のような翻訳能の低さではなく *I N S* 配列の存在による *m R N A* の不安定性が問題となる *g a g* 遺伝子を再設計するためにも適用できる。*I N S* の影響を抑制する *R e v* の役割は *H I V - 1* の場合においてのみよく研究されているが、他のレンチウィルスもすべて *R e v* と類似のタンパク質をコードすることが公知である。同様に、ヒト *T* 白血病ウィルスおよびウシ白血病ウィルス (*H T L V* および *B L V*) も *R e v* をコードする。メーソン-ファイザーサルウィルスおよびサルレトロウィルス-1 (*S R V - 1*) などの単純なレトロウィルスは、スプライシングされない *m R N A* を核から搬出する構成的輸送配列 (*C T E*) を含む。*C T E* は *R R E* と相互作用する *R e v* を機能的に置換できることが示されている。実際にこの発明の方法を使って、*S R V - 1* の下流の *C T E* を有する野生型インテグラーゼ遺伝子からの低レベルの一過性発現が得られた。この発明に従った合成遺伝子の設計は *R e v* の共発現および構造における *R R E* または *C T E* の存在をまったく必要としないため、このアプローチは一般的なレトロウィルス酵素および特にインテグラーゼの発現を改善できる。

【 0 0 3 8 】

哺乳動物の発現ベクターの作成には、さまざまな真核生物発現プラスミドを用い得る。発現は構成的プロモータ（たとえば *h C M V* および *R S V*）または誘導性プロモータの制御下にあってもよい。（商業的に入手可能な）誘導性発現システムの例は、エクジソン誘導性およびテトラサイクリン誘導性 (*T e t - オフ* および *T e t - オン*) 発現システムである。特定の組織における発現を制限する組織特異的プロモータも考えられる。その例は、確立されたニューロン特異的プロモータ *T h y - 1* およびエノラーゼである。インテグラーゼを安定に発現する細胞系が得られたが、誘導性プロモータは細胞毒性を制限し得る。合成遺伝子を保持するヒト以外のトランスジェニック動物においては、誘導性プロモータを用い

て所望のときに発現を誘導しても、または組織特異的プロモータを用いて所望の組織において発現を誘導してもよい。

【 0 0 3 9 】

2 9 3 T および H e L a 細胞における H I V - 1 インテグラーゼの一過性および安定発現

インテグラーゼに対する合成遺伝子 (I N^s) を、発現ベクター p C E P 4 および p B K - R S V 中の、それぞれヒトサイトメガロウィルス (h C M V) およびラウス肉腫ウィルス (R S V) プロモータの制御下にクローニングした。2 9 3 T および H e L a 細胞系の両方において I N の一過性発現および安定発現が得られ、それらは免疫プロットティング (図 1、図 3) および間接免疫蛍光 (データは示さず) によって確認された。トランスフェクションされた 2 9 3 T 細胞において、h C M V プロモータからの発現レベルは 10×10^4 個の細胞当たり $10 - 20 \mu g$ の I N となり、これは融合されていない野生型 H I V - 1 インテグラーゼ遺伝子を含む発現ベクターによって得られる量よりも少なくとも 2 5 倍高い。

【 0 0 4 0 】

エピソーム発現ベクター p C E P - I N^s によって 2 9 3 T 細胞をトランスフェクションし、ハイグロマイシン B によって選択して得られた安定な細胞系を 2 9 3 T - I N^s と名付けた。間接免疫蛍光染色により、選択した細胞の 8 0 - 9 0 % が検出可能なレベルのインテグラーゼを生成することが示された。定量的免疫プロットティングによって評価された発現レベルは、 10×10^4 個の細胞当たり約 $0.5 \mu g$ のインテグラーゼであった。2 9 3 T - I N^s の細胞生育速度の減少 (親 2 9 3 T 細胞系に比べて 3 0 - 5 0 %) は、哺乳動物細胞におけるインテグラーゼの細胞毒性を示唆する。

【 0 0 4 1 】

H e L a 細胞において、インテグラーゼは核内にのみ見出された。2 9 3 T 細胞においては、一過性トランスフェクションにより典型的には I N の不規則な顆粒状の細胞質分布が得られ、これは恐らくはタンパク質の沈殿によるものである。I N の安定発現に対して選択された 2 9 3 T 細胞系においては、I N の核局在性は明らかであった。有糸分裂の中期および後期ステップにおいて、I N は染色

体と安定に結合したままだった。

【 0 0 4 2 】

一過的にトランスフェクションされた293T細胞から精製されたインテグラーゼの固相N末端配列決定により、次のアミノ末端が明らかになった：Gly-Phe-Leu-Asp-Gly-Ile-Asp-Lys。これは合成遺伝子から予測される配列であり、開始メチオニンは翻訳後に除去される。

【 0 0 4 3 】

I N^sの機能性

I N欠損ベクター粒子の相補

哺乳動物細胞において合成遺伝子から発現されたインテグラーゼが酵素活性を有するかどうかを実証するために、I Nがインテグラーゼ欠損H I V由来のレンチウィルスベクターを相補する能力を試験した。H I V-1由来のレンチウィルスベクターはナルディーニ (Naldini) らおよびズファレイ (Zufferey) らによって開発された (ナルディーニら(1996), Science 272: 263-267; ズファレイら(1997), Nature Biotechnol. 15: 871-875)。ウィルスのg a gおよびp o lタンパク質をコードするパッケージングプラスミドと、水疱性口内炎ウィルスのエンベロープをコードするプラスミドと、2つの末端反復配列(L T R)に隣接するレポータ遺伝子をコードするプラスミドとで293T細胞をトランスフェクションすることにより、シュードタイプのレンチウィルスベクター粒子を生成した。e n v以外のすべてのH I V遺伝子を含む第1世代パッケージングプラスミドp C M V Δ R 8. 2と、転移ベクターp H R' - C M V L a c Zとを用いて野生型ベクター(W Tベクター)を生成した。p C M V Δ R 8. 2 I N (D 6 4 V) (ナルディーニら(1996), Science 272: 263-267)を用いてインテグラーゼ欠損ウィルス粒子(D 6 4 Vベクター)を生成した。インテグラーゼ遺伝子のD 6 4 V変異は、感染のその他のステップに影響することなくインテグラーゼ活性をなくすることが公知である (レアヴィット (Leavitt) ら(1993), J. Biol. Chem. 268: 2113-2119; レアヴィットら(1996), J. Virol. 70: 721-728)。293T細胞におけるD 6 4 Vベクターの形質導入力価はW Tベクターの力価よりも20倍低かった (表1)。このことは以前に報告された結果 (ナルディーニら(1996),

Science 272: 263-267) とよく一致する。D 6 4 V 形質導入後の β -ガラクトシダーゼ発現は細胞の継代培養によって大幅に減少する (表 1) ため、D 6 4 V 形質導入後に観察される「バックグラウンド」発現のほとんどは組み入れられなかった円形のウィルス DNA からの転写によるものである。しかしいくつかの形質導入実験においては 1 個または 2 個のガラクトシダーゼ陽性コロニーが観察された。D 6 4 V ウィルスの残余形質導入活性は以前に観察されている (ガウル (Gaur) およびレアヴィット (1998), J. Virol. 72: 4678-4685) 。この組込みはウィルスインテグラーゼに依存しない可能性がある。

【 0 0 4 4 】

合成遺伝子を含む発現ベクター p C E P - I N^sを含む産生細胞の 4 重一過性トランスフェクションの後、相補されたベクター (C I N) を生成した。C I N によって形質導入活性は最大 3 0 % に回復した (表 1) 。形質導入された細胞の複数回の継代培養後にも同じ割合のガラクトシダーゼ陽性コロニーが数えられたため、相補は安定な組込みによるものであった。I N 欠損ウィルスのトランス相補の原理は、以前に V P R - I N 融合体発現構造を用いて示された (フレッチャーら (1997), EMBO J. 16: 5123-5138) 。I N の触媒ドメイン変異の形質導入活性は V P R - I N によるトランス相補によって最大 2 0 % に回復した。しかし V P R の不在下では、野生型インテグラーゼに対する発現構造は 0 . 0 4 % の相補効率しか達成しなかった (フレッチャーら (1997), EMBO J. 16: 5123-5138)) 。V P R 不在下のこの発明に従った合成遺伝子は、それより 7 5 0 倍顕著な相補活性を得る。

【 0 0 4 5 】

さらに、標的細胞において合成遺伝子から発現されるインテグラーゼのトランス相補活性に対する証拠が得られた (表 1) 。I N 発現 2 9 3 T 細胞の I N 欠損ウィルス粒子による形質導入は、親 2 9 3 T 細胞に比べて高い形質導入効率を示した。形質導入した細胞の継代培養後、その差はより明白になった。これは受容器細胞に存在するインテグラーゼと入来するベクターの組込み前の複合体との触媒相互作用を示す。野生型および相補されたベクターに対しても増加した形質導入効率が得られた。このことは、ウィルス粒子中に存在する活性インテグラーゼ

の量が用量制限的であるか、または標的細胞に存在するインテグラーゼが阻害的な宿主因子を無効にしていることを示唆するかもしれない。

【 0 0 4 6 】

プロモータのないレポータ遺伝子を用いたインテグラーゼ活性の検出 (D I P R)

染色体におけるH I Vの組込みは厳密な配列特異性を示さないが、組込み部位に対する弱いコンセンサスが見出された (カートー (Carteau) ら (1998), J. Virol. 72, 4005-4014)。レトロウィルスの組込みは活性転写ユニットに近い、またはその中にある開いたクロマチンにおいて好まれることが、正式には証明されていないが一般的に受け入れられている (ロードヴォールド (Rohdewohld) ら (1987), J. Virol. 61: 336-343; シャーディンら (1990), J. Virol. 64, 907-912; ヴィジャヤ (Vijaya) ら (1986), J. Virol. 60: 683-692; カートーら (1998), J. Virol. 72, 4005-4014)。細胞培養液中のインテグラーゼ活性を測定するための、プロモータのないレポータ基質の設計はこの発見に基づいている (図 4 A - C)。この発明の実施例に従うと、染色体の活性に転写される領域内に挿入されると、組込まれたプロモータのないレポータ遺伝子のリードスルー転写が起こる方法が提案される。設計された構造は、インテグラーゼ認識部位を与えるH I V L T Rの200bpの末端フラグメントに隣接する直鎖状DNAフラグメントである。マーカ遺伝子はたとえばルシフェラーゼをコードしてもよい。ルシフェラーゼのオープンリーディングフレームの前にI R E S (内部リボソームエントリ部位) が存在することにより、m R N A転写産物のキャップ非依存的翻訳が起こる (図 4 A)。

【 0 0 4 7 】

このD I P R基質によってトランスフェクションした後 (図 4 B、C)、293 T - I N^s細胞において測定されたルシフェラーゼ活性は常に親293 T細胞よりも4から10倍高かった (表2)。D I P Rアッセイにおいて、D 6 4 V変異インテグラーゼの活性は野生型インテグラーゼに比べて減少していた (データは示さず)。これらの結果は、細胞内で発現された (この発明に従った合成遺伝子によって発現された) インテグラーゼの活性を示す (図 4 C)。A l u - P C

Rを用いた合成遺伝子からインテグラーゼを一過的に発現する293T細胞における組込まれた直鎖状DNA分子の配列決定から、組込体の10%における3' GTジヌクレオチドの特徴的な除去が示された。インテグラーゼを発現しない対照細胞においては、どのDNA挿入物もこの特徴を示さなかった。

【0048】

適用

この発明の実施例は、合成遺伝子の生成に基づいた、たとえばHIV-1インテグラーゼなどのレトロウィルス酵素に対する効率的な真核生物発現ベクターの構築を含む。あらゆる確立されたトランスフェクション手順による真核細胞へのプラスミドのトランスフェクションの後、真核生物発現ベクターからの発現は一過性であってもよい。発現ベクターを安定に保持する細胞系においては、発現は永続的であってもよい。この発明およびその適用の重要な局面は、発現された酵素活性を有するレトロウィルスタンパク質の機能性であり、これは酵素活性を有さないレトロウィルスタンパク質の単なる高レベル発現とは対照的である。

【0049】

インテグラーゼ阻害剤の評価のための細胞内インテグラーゼ試験

この発明の実施例は、いわゆるミニHIVと呼ばれるHIVLTRのフラグメントに隣接するDNA基質によってトランスフェクションされた細胞におけるインテグラーゼ活性を評価するためのアッセイを含む。両方のアッセイにおいてデータはINの酵素活性を示す。

【0050】

DIAS（抗生物質選択によるインテグラーゼ活性の検出）試験においては、ミニHIVのDNA中に細胞毒性薬剤に対する耐性遺伝子が存在する。トランスフェクションされた細胞にINが存在することにより、染色体への耐性遺伝子の安定な挿入が促進される。細胞毒性薬剤に対して耐性のコロニーの残数を、異種DNAによってトランスフェクションした細胞と比較することによってスコアリングを行なった。

【0051】

DIPR（プロモータのないレポータ遺伝子を用いたインテグラーゼ活性の検

出)においては、ミニHIVの内部リボソームエントリ部位(IRES)の下流にプロモータを有さないレポータ遺伝子(ルシフェラーゼ)が存在する(図4A)。トランスフェクションされた細胞にINが存在することにより(図4B)、細胞のプロモータのすぐ近くにおける宿主染色体へのレポータ構造の安定な挿入が促進される(図4C)。プロモータのないマーカー遺伝子から発現されるたとえばルシフェラーゼなどの酵素活性を測定することによってスコアリングを行なう。後者のアッセイはマイクロタイタプレート形式での細胞培養液におけるインテグラーゼ阻害剤の評価に非常に適しており、高スループットスクリーニングに適合可能である。可能性のあるインテグラーゼ阻害剤によって、プロモータのないマーカー遺伝子からの検出可能な信号のレベルがなくなったり、または顕著に減少したりし得る。

【0052】

この発明に従ったこうしたアッセイは、合成または天然化合物の大きなライブラリからの試験阻害化合物のスクリーニングを含む。合成化合物ライブラリは、たとえばメイブリッジ・ケミカル・カンパニー(トレビレット、コーンウォール、UK)、コムジェネクス(Comgenex)(プリンストン、NJ)、ブランドン・アソシエーツ(メリマック、NH)およびマイクロソース(ニューミルフォード、CT)などから商業的に入手可能である。希少な化学物質ライブラリはアルドリッチ・ケミカル・カンパニー(ミルウォーキー、WI)から入手可能である。代替的には、バクテリア、菌類、植物および動物抽出物の形の天然化合物のライブラリは、たとえば新化学物質(New Chemical Entities)、パン研究所、ボーゼル、WAまたはマイコサーチ(MycoSearch)(NC)、キロン(Chiron)などから入手可能であり、また容易に製造可能である。植物抽出物はベルギーのゲント大学からも得られる。加えて、天然および合成して作成されたライブラリおよび化合物は従来の化学的、物理的、および生物的手段によって容易に変更される。

【0053】

非ウィルス性細胞遺伝子伝達のための手段

合成遺伝子からインテグラーゼを発現する細胞系は、LTRフラグメントに隣

接する外来DNAを組み込みやすい性質を有する。したがってこれらの細胞系はより形質導入しやすい。この発明の実施例は、高度に形質導入しやすい（親細胞に比べて少なくとも200%の）真核細胞系（または細胞培養システム）の生成である。この発明の実施例はまた、プラスミドからの一過性発現によって、または合成遺伝子を遺伝子転移したES細胞におけるレトロウィルスインテグラーゼの発現誘導の後に、ES細胞における（非）相同組替えの効率を増加させるための、トランスジェニック技術における適用を含む。この発明に従った合成遺伝子はあらゆるトランスフェクション剤または方法（たとえばエレクトロポレーションまたはリポフェクションなど）によって細胞に入れられてもよく、その結果染色体にDNAを安定に組込んでもよい。

【 0 0 5 4 】

レトロウィルス（レンチウィルス）ベクターパッケージング構造

相補実験から、産生細胞において合成遺伝子から発現されるインテグラーゼはパッケージングプラスミドによってコードされるインテグラーゼ欠損レンチウィルスのウィルス粒子を相補でき、したがってパッケージング構造によって発現されるタンパク質の代わりができることが明らかである。したがってレンチウィルスのgag-pol遺伝子に対する1つまたはそれ以上の合成遺伝子に基づく発現ベクターにおいて、合成遺伝子はパッケージング構造中の自然の遺伝子の代わりができ、その結果Rev非依存性の高レベルタンパク質発現が得られる。この発明は、HTLV-1の場合にはRexなどのRev相同体にタンパク質発現が依存する、非レンチウィルス複合レトロウィルスに基づくパッケージング構造を含む。非分裂細胞を形質導入できるレンチウィルスベクター自体は当該技術分野において公知である（ナルディーニら(1996), Science 272: 263-267, ズファレイら(1997), Nature Biotechnol. 15: 871-875を参照）。一般的にベクターはプラスミドベースまたはウィルスベースであり、核酸の組み込み、選択、および宿主細胞における核酸の転移のために必須の配列を保持するように構成される。対象となるgag、polおよびenv遺伝子は当該技術分野において公知である。簡単にいうと、第1のベクターがウィルスgagおよびウィルスpolをコードする核酸を与えてもよく、第2のベクターがパッケージング細胞を生成するため

のウィルス *env* 遺伝子産物をコードする核酸を与えてもよい。パッケージング細胞または細胞系は感染性のビリオンを生成するために必要なタンパク質をトランスに供給し、それ自身は内在性のウィルスゲノム核酸をパッケージングできない (ワタナベおよびテミン (1983), *Molec.*

Cell Biol. 3(12): 2241-2249; マンら (1983), *Cell* 33:153-159; エンプレトソンおよびテミン (1987), *J. Virol.* 61(9): 2675-2683)。こうしたパッケージング細胞に異種遺伝子を与えるベクターである転移ベクターを導入することにより、目的の外来遺伝子を有する感染性の粒子を放出する産生細胞が得られる。トランスフェクションまたは感染の方法は当業者によって周知である。パッケージング細胞または細胞系にパッケージングベクターおよび転移ベクターを同時トランスフェクションした後、組替えベクターを培養液から回収し、当業者に用いられる標準的な方法によって力価を測定する。

【 0 0 5 5 】

転移ベクターによって保持される外来または異種遺伝子は転写可能なあらゆる目的核酸であってもよいが、治療的な利益を有する、または遺伝子治療に対する興味を持たれるポリペプチドをコードする核酸であることが好ましい。(第2の)パッケージングベクター中の *env* 遺伝子はレトロウィルスを含むあらゆるウィルスに由来していてもよく、またヒトおよびその他の種の細胞の形質導入を可能にする両栄養性であることが好ましく、非内在性調節配列の制御下にあることが好ましい。ベクターは、*env* タンパク質を特定の細胞型の特定の受容体に対する抗体またはリガンドとつなぐことによって、標的特異的にされてもよい (細胞ターゲティング)。

【 0 0 5 6 】

gag-pol 合成遺伝子の設計は、これらの野生型遺伝子に関連する *mRNA* の不安定性を回避するための方法に基づく。活性 *HIV-1* インテグラーゼの高レベルおよび *Rev* 非依存的真核生物発現のための発現構造を生成するために我々が用いる方法が優先的に用いられる。自然の *gag-pol* 遺伝子をそれぞれこの発明の合成遺伝子によって置換する、この発明のベクターのさらなる構築は、当該技術分野においてよく理解されている標準的なライゲーションおよび制

限酵素技術を用いる（マニアティスら、モレキュラー・クローニング：ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、N.Y., 1982を参照）。

【 0 0 5 7 】

バイオセーフティは、組替え複製コンピテントレトロウィルス（RCR）が生じる危険性をできる限り減少させるための方策を必要とする。パッケージング機能を2つのゲノムに分割し、その一方がgagおよびpol遺伝子を発現し、他方がenv遺伝子産物を発現することは、RCRが生じる可能性を最小化することを助ける。そのアプローチは2つのゲノムの同時パッケージングおよびその後の転移のおそれを最小化するだけでなく、パッケージング細胞に3つのレトロウィルスゲノムが存在することによる組替えによるRCR生成の頻度を大幅に減少させる。あらゆる可能な組替えが機能しないようするため、突然変異（ダノスおよびムリガン（Mulligan）（1988）, Proc Natl. Acad. Sci 85: 6460-6464）または欠失（ボッセルマン（Bosselman）ら（1987）, Molec. Cell Biol. 7(5):1797-1806; マルコヴィッツ（Markowitz）ら（1988）, 62(4):1120-1124）を所望でない遺伝子産物内に構成してもよい。両方のパッケージング構造の3'LTRを欠失させることで、機能的組替え体が形成する可能性をさらに減少させる。US 5, 994, 136号は、転写メカニズムを通じてウィルス発現を行なう調節タンパク質をコードするtat遺伝子を機能的に欠失させることにより、複製コンピテントレンチウィルスの生成の可能性をさらに低くしたレンチウィルスベクターの生成を記載する。gag遺伝子の一部など、レンチウィルスの自然の遺伝情報をなおも含む転移ベクターと、合成パッケージング遺伝子との間の組替えの可能性が大幅に減少するため、レンチウィルスベクターのバイオセーフティがさらに改善される。自然の遺伝子に比べて3番目の位置のヌクレオチドの置換によって誘導されるようなDNA配列のミスマッチは、広範囲の種において相同組替えに対するかなりの障壁を提供するようである。したがって混入または内在性HIVウィルス粒子が組替えを通じて自然のインテグラーゼ遺伝子を合成遺伝子と交換することもないと考えられる。

【 0 0 5 8 】

実験手順

DNA構造

インテグラーゼ発現プラスミドの構築

H I V - 1 クローン H X B 2 由来の I N のオープンリーディングフレームを、P f u D N A ポリメラーゼ（ストラタジーン、ケンブリッジ、UK）を用いてプライマー 5' - C C C C C A A G C T T G C C A G C C A T G T T T T T A G A T G G A A T A G A T A A G G および 5' - C C C G C T C G A G C T T T C C T T G A A A T A T A C A T A T G G T G によって P C R 増幅し、p C E P 4（インビトロジェン、リーク、オランダ）にサブクローニングして p C E P - I N を得た。DNA 配列決定により変異がないことを確認した。H I V - 1 クローン H X B 2 の R R E 配列を、プライマー 5' - T T C C G C T C G A G T A G C A C C C A C C A A G G C A A A G A G および 5' - T C G C G G A T C C A A G G C A C A G C A G T G G T G C A A A T G を用いて P C R 増幅した。この P C R フラグメントを p C E P - I N 中のインテグラーゼ遺伝子の下流にセンス方向にサブクローニングし、p C E P - I N - R R E を生成した。C T E 配列（プラスミド p S 1 2 から得た；タベルノら，1996，J. Virol. 70:5998-6011）を p C E P 4 中に正しい方向にクローニングし、その後 C T E の上流にインテグラーゼ遺伝子を挿入した。その結果プラスミド p C E P - I N - C T E が得られた。p G F P - I N の構築は、プリユイメルスら（1999），（Virology 258:327-332）によって説明されている。R e v 発現プラスミド p E F 3 2 1 - c R E V は、サンドス・フォーシュングス・インスティテュート（Sandoz Forschungs Institut）（ウィーン、オーストリア）から提供された。P C R 増幅およびプラスミド構築は、標準的なライゲーションおよび制限酵素技術などの標準的な技術ならびに当該技術分野においてよく理解された条件を用いた（マニアティスら，モレキュラー・クローニング：ラボラトリー・マニュアル，コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー，N.Y.，1982を参照）。

【 0 0 5 9 】

合成遺伝子の組立て

制限酵素切断部位 N h e I、P s t I、B a m H I、N a e I、N a r I（図

2に示す) によって合成遺伝子の配列を各々約150bpの長さの6つのフラグメントに分割し、それらは配列1-149、144-306、301-456、451-623、618-776、771-930に対応する(図2)。各フラグメントは、シーケナーゼ(Sequenase)(アマシャム-ファルマシア、バッキンガムシア、UK)を用いて2つの部分的に相補するオリグヌクレオチド(85-95ntの長さ、PAGE精製および5'リン酸化、ギブコBRLライフ・テクノロジー、メルルベケ(Merelbeke)、ベルギーにより合成)をアニーリングおよび伸長することによって別個に構築した。各フラグメントをベクターpBluescriptKS(+)(ストラタジーン、ラホーヤ、CA)のEcoRV部位にクローニングした。得られたクローンに見出された配列の誤りは、*Pyrococcus furiosus*(Pfu)ポリメラーゼによるストラタジーン・クイック・チェンジ手順(フラグメント451-623における塩基置換のため)、またはPCR(フラグメント1-149の末端領域の欠失のため)を用いて修復した。WO98/12207号に記載される方法と類似のフラグメントの段階的組立てによって、全930bpの配列を構築した。各ステップにおけるクローニングベクター(pBluescriptKSまたはSK)の選択は、INをコードするDNAの毒性によって決まった。最後にIN遺伝子の2つの半体(1-451および452-930)をともにライゲーションし、pBluescriptKS(+)にクローニングして、pIN^sを得た。

【0060】

IN^sに対する哺乳動物発現ベクターの構築

プラスミドpIN^sをEcoRIによって切断し、T4DNAポリメラーゼで処理した後、XhoIにより制限酵素処理した。IN^s遺伝子を有する1kbのフラグメントをpCEP4(インビトロジェン、リーク、オランダ)のPvuIIおよびXhoI部位の間にクローニングして、pCMV-IN^sを得た。pCEP4はエピソードの哺乳動物発現ベクターで、ヒトサイトメガロウィルス(hCMV)の直前エンハンサー/プロモータを含む。エプスタインバーウィルス複製起点(oriP)および核抗原(EBNA-1遺伝子によってコードされる)により、ヒト、霊長類およびイヌ細胞における染色体外複製が可能である。ハイグ

ロマイシン耐性遺伝子が存在するため、ハイグロマイシンB（ギブコBRL）によって安定に形質導入されたクローンを選択できる。同じ1kbのフラグメントをpBK-RSV発現ベクター（ストラタジーン）のNheIおよびXhoI部位の間にもクローニングし（ベクターDNAのNheI粘着末端はT4DNAポリメラーゼを用いて埋めた）、pRSV-IN^sを得た。このベクターにおいて、IN^s遺伝子の発現はラウス肉腫ウィルス（RSV）のプロモータによって行なわれる。ネオマイシン耐性遺伝子が存在するため、ジェネティシン（G418）（ギブコBRL）によって安定に形質導入されたクローンを選択できる。

【0061】

DIPRアッセイのための基質の構築

DIPRアッセイのためのDNA基質は、ScaIによるpLTR-IRES-Lucの直鎖化によって得られた。このプラスミドは以下の態様で構築された。最初に、HXB2のHIV-1LTRの末端のU3およびU5領域を含むpU3U5（ツエレパノフら(1999), Nucleic Acids Research 27:2202-2210）の350bpのKpnI/EcoRIフラグメントを、pUC19のKpnIおよびEcoRI部位の間にクローニングし、pUC-LTRを得た。次いで、pUC-LTRをScaIによって部分分解し、Tn5トランスポゾンからのカナマイシン耐性遺伝子を含むフラグメントを挿入することによって、pUC19のアンピシリン耐性遺伝子の中にあるScaI部位を破壊し、pUC-LTR-kanを得た。最後に、IRES-ルシフェラーゼ遺伝子カセットを有するpBIR（マルチネス-サラス（Martinez-Salas）ら(1993), J. Virol. 67, 3748-3755）のBamHI/PstIフラグメントをT4DNAポリメラーゼ（ギブコBRL）によって平滑化し、pUC-LTR-kanのSmaI部位にクローニングすることによって、7.5kbのpLTR-IRES-Lucを得た。

【0062】

細胞培養

HeLaおよび293細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから得られた。HeLaおよび293細胞を、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）（ギブコBRL）に10%のFCSと、0.12%（v/w）の重炭

酸ナトリウム（ギブコBRL）と、2 mMのグルタミン（ギブコBRL）と、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のゲンタマイシン（ギブコBRL）とを追加した培地で、 37°C にて5% CO_2 加湿大気中で培養した。293T細胞（フランス、エヴリーのO. ダノス博士より入手）はSV40 ラージT抗原を発現し、DMEM（ギブコBRL）およびグルタマックス（glutamax）に10%のウシ胎児血清と、 $45 \text{ U}/\text{ml}$ のペニシリンG（セルバ（Serva）、ハイデルベルク、ドイツ）と、 $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸ストレプトマイシン（シグマアルドリッチ、ボーネン、ベルギー）とを追加したものにて培養した。

【 0 0 6 3 】

293および293T細胞を、ポリエチレンイミン（PEI）（アブダラ（Abdallah）ら（1997），Hum. Gene Therapy 7:1947-1954）を用いてトランスフェクションした。ポリエチレンイミン Mw \sim 25,000 はシグマアルドリッチ（ボーネン、ベルギー）より得た。細胞はDMEMにグルコース、グルタマックスおよび10%のウシ胎児血清（FCS）（ギブコBRL）を加えたものにおいて、50-70%集密するように培養した。トランスフェクションの3時間前に培地を1%のFCSを含む培地に交換した。DNAおよびPEIの混合物を培地の最小体積において細胞に加えた。翌日、培地を25 mMのHEPESを含むDMEMに交換した。この態様で、有効に得られた形質転換は50-80%であった。HeLa細胞はエレクトロポレーションによって慣例的にトランスフェクションした。まず80%集密した細胞をトリプシン処理し、低速遠心分離によって沈殿させた。次いで細胞を生育培地中に、 2×10^6 細胞/ ml の密度になるよう再懸濁した。この溶液の0.5 mlを4 mmキューベット（ユーロジェンテック（Eurogentec）、スラン、ベルギー）にアリコートし、細胞懸濁液に $20 \mu\text{g}$ のDNAを加えた。電気パルス（ $10 \mu\text{F}$ 、250 V）の後、細胞を室温にて10分間休止させてから生育培地に希釈した。

【 0 0 6 4 】

IN^s遺伝子を発現する安定な細胞系を確立するために、pRSV-IN^sまたはpCMV-IN^sでトランスフェクションした細胞を、それぞれ $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ のジェネティシン（G418）または $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のハイグロマイシン

B（どちらもギブコBRLより）の存在下で培養した。INの発現は、ウエスタンブロッティングおよび／または間接免疫蛍光によって評価した。

【0065】

ウエスタンブロッティングおよび免疫蛍光

ウエスタンブロッティングおよび間接免疫蛍光のために、組替えHis標識HIV-1INに対するウサギポリクローナル抗体を生成し、確立された手順（オースベル（Ausubel）ら（1987），分子生物学の最新プロトコル（Current protocols in molecular biology），ジョン・ワイリー・アンド・サンズ，ニューヨーク）に従って、HiTrap r Protein Aカラム（ファルマシアバイオテク、ウプサラ、スウェーデン）を用いて精製した。ウエスタンブロッティングは、PVD F膜（バイオラッド）、ECL+化学ルミネセンス検出システム（アマシャム-ファルマシア）、およびHRP複合ヤギ抗ウサギ抗体（バイオラッド）を用いて行なった。用いた希釈は一次抗体に対して1：30000、二次抗体に対して1：20000であった。検出限界は組替えインテグラーゼ0.1-0.5 ngであった。総タンパク質濃度は、1% SDS / 1 mM PMSF（シグマ）で溶解した細胞に対して、BCAプロテインアッセイ（ピアス、イリノイ、USA）を用いて定めた。ウエスタンブロッティング分析に対しては、総タンパク質量10 μgを評価した。

【0066】

間接免疫蛍光顕微鏡検査によってin situのIN発現を検出するために、細胞をガラススライドの上（HeLa細胞）またはパーマノックス（permanox）チャンバースライド（ギブコBRL）の中（293T細胞）で培養した。24-48時間後、リン酸緩衝食塩水（PBS）に1 mMのMg²⁺および0.5 mMのCa²⁺を追加したもの（PBS+）で細胞を洗浄し、100%メタノール中で固定し、PBS+中の10%ウシ胎児血清（FCS）でブロッキングした。抗体とのインキュベーションは、ブロッキング溶液中で37℃にて行なった。一次抗体（ウサギ抗IN）は1：20から1：80に希釈した。二次抗体のFITC複合ブタ抗ウサギ抗体（ダコ、グロストラップ、デンマーク）は1：40に希釈した。核染色は、メタノール中の1 μg / mlの4', 6-ジアミジノー-2-フェニルイ

ンドール (D A P I) (シグマ) によって行なった。蛍光顕微鏡検査は、ライツ顕微鏡 (ヴェツラー、ドイツ) によって、フィルタブロック I 2 (F I T C) または A (D A P I) を用いて行なった。

【 0 0 6 7 】

プロモータのないレポータ遺伝子を用いたインテグラーゼ活性の検出 (D I P R)

トランスフェクションの 2 4 時間前に、2 9 3 T および 2 9 3 T - I N⁺ 細胞を 6 ウェルプレートに 1 0⁵ 細胞/ウェルの密度で接種した。P E I を用いてウェル当たり 5 μ g の D N A をトランスフェクションした。トランスフェクションの 4 8 時間後、5 x 1 0⁵ 個の細胞を溶解し、ルシフェラーゼアッセイシステムTM (プロメガ・ベネルクス、ライデン、オランダ) およびルミカウントTM (バックアード、メリデン、C T) を用いてルシフェラーゼ活性を定めた。溶解物のタンパク質濃度はブラッドフォード法 (バイオラッドプロテインアッセイ、バイオラッド、ハーキュリーズ、C A) を用いて定めた。ルミネセンス値をタンパク質濃度で割ることにより、ルシフェラーゼの比活性を算出した。

【 0 0 6 8 】

レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターの生成

水疱性口炎ウイルス (V S V) のエンベロープによってシュードタイプにされた H I V - 1 由来のベクター粒子は、2 9 3 T 細胞を、ウイルス g a g および p o l タンパク質をコードするパッケージングプラスミド (p C M V Δ R 8 . 2) と、水疱性口炎ウイルスのエンベロープをコードするプラスミド (p M D G) と、2 つの末端反復配列 (L T R) に隣接するレポータ遺伝子をコードするプラスミド (p H R ' - C M V L a c Z) とでトランスフェクションすることによって生成した。e n v 以外のすべての H I V 遺伝子を含む第 1 世代のパッケージングプラスミドと、転移ベクターとは O. ダノス博士 (ジェネトン、フランス) のご好意により頂いた。1 0 c m ディッシュの 2 9 3 T 細胞のトランスフェクションのために、3 つのプラスミドの混合物 7 0 0 μ l を 1 5 0 m M の N a C l 中に作った (2 0 μ g のベクタープラスミド、1 0 μ g のパッケージング構造、お

よび $5 \mu\text{g}$ のエンベローププラスミド)。このDNA溶液に、 $700 \mu\text{l}$ のPEI溶液 (150 mM のNaCl中に $11.0 \mu\text{l}$ の 10 mM ストック溶液) をゆっくり加えた。室温で15分置いた後、1%のFCSを加えたDMEM培地中の293T細胞に、このDNA-PEI複合体を1滴ずつ加えた。1晩インキュベートした後、培地を10%のFCSを含む培地と交換した。トランスフェクション後2日から5日の間に上清を回収した。スイングングバケツロータ (SW27ベックマン、パロアルト、CA) 中で $25,000 \text{ rpm}$ で2時間、 4°C にて超遠心することによりベクター粒子を沈殿させた。ペレットをPBSに再懸濁して100倍の濃度を得た。異なるウィルスストックはp24抗原濃度 (HIV-1 p24 コアプロファイル ELISA、デュポン、ドライアイヒ、ドイツ) に基づいて標準化し、相補アッセイに用いた。

【0069】

相補実験

インテグラーゼ欠損ウィルス粒子は、パッケージングプラスミド (ナルディーニら (1996), Science 272: 263-267) としてD. トロノ博士 (ジュネーブ、スイス) より得られた pCMV Δ R8.2IN (D64V) を用いて生成した。相補されたベクターは、4重一過性トランスフェクションの後に293T細胞において pCEP-IN^s からインテグラーゼを発現させることにより生成した。ベクター調製はp24抗原カウントに対して標準化した。ベクターを $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレンの存在下で標的細胞に加え、1晩放置した。ベクターを除去した後、細胞をさらに36時間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、PBS中の0.75%ホルムアルデヒド/0.05%グルタルアルデヒドで固定し、要時調製したX-gal基質 (PBS中に 5 mM のフェロシアン化カリウム、 5 mM のフェリシアン化カリウム、 2 mM の MgCl_2 、および $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (x-gal) (バイオテック・トレード・アンド・サービス・GmbH, St. Leon-Rot, ドイツ)) によって 37°C にて1晩染色した。各形質導入実験は96ウェルプレートにおいて重複させて行なった。形質導入効率は、感染の48時間後にウェルの1つにおける青い細胞の数を数えることによって定め、重複したウェルの細胞を1

: 2 に分けた。サンプルの半分はウェル中に残し、集密させて染色した (継代 1) のに対し、他方の半分は 48 ウェルプレート中で培養した。集密すると、これらの細胞を再び 1 : 2 に分けた。最後に細胞を 24 ウェルプレートに入れて集密するまで培養した (継代 3、希釈 1 : 8)。染色後、安定な形質導入の効率を青いコロニーを数えることによって測定した。

[0 0 7 0]

表

[0 0 7 1]

[表 1]

表 1 インテグラーゼ欠損レンチウイルスベクター粒子の相補性
相対的な形質導入効率¹

細胞	継代	WT ベクター	D64V ベクター	C IN
293T				
	#0	1.00	0.048	0.303
	#3	1.00	0.007	0.320
293T IN ^S				
	#0	1.565	0.09	0.510
	#3	1.88	0.045	0.75

¹ 形質導入効率は、293T 細胞において WT ベクターによって得られる形質導入効率に対してガラクトシダーゼ陽性細胞 (#0) またはガラクトシダーゼ陽性細胞のコロニー (#3) を計数することによって定められる。WT ベクター、D64V IN 欠損ベクター、および産生細胞中の IN によって相補された D64V ベクターによる形質導入の結果を示す。標準化した量のベクターを細胞に感染させた。293T 細胞および IN を安定に発現する 293T 細胞の両方で形質導入を行なった。2 度の実験に対する平均値を示す。

[0 0 7 2]

[表 2]

表 2 プロモータのないレポータ遺伝子を用いた
インテグラーゼ活性の検出 (DIPR)

実験	細胞系	ブランク ^a	ルシフェラーゼ活性 (相対ユニット)	
			LTR-IRES -Luc ^b	LTR-IRES-Luc +pCMV-IN ^{Sc}
A	293T	1	47±1	-
	293T-IN ^S	1	487±119	-
B	293T	1	130±24	489±169
	293T-IN ^S	1	499±38	990±183

^a細胞系における相対的バックグラウンドルシフェラーゼ活性。

^b実験条件 A においては、293T および 293T-IN^S を等量の直鎖状 pLTR-IRES-Luc でトランスフェクションした。実験 B においては、合計 DNA 濃度を親ベクター pCEP4 に等しくした。

^c293T および 293T-IN^S を直鎖状 pLTR-IRES-Luc および 2 μ g の pCMV-IN^S でトランスフェクションした。

【 0 0 7 3 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<110> K .U. Leuven Research & Development
 Debyser, Zeger
 De Clercq, Erik
 Cherepanov, Peter
 Pluymers, Wim

<120> A synthetic gene for expression of a retroviral protein
 with wild type activity in eukaryotic cells

<130> K1291-PCT

<140>
 <141>

<150> EP99201306.0
 <151> 1999-04-26

<150> EP00200171.7
 <151> 2000-01-18

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 930
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic gene
 expressing HIV integrase

<220>
 <221> CDS
 <222> (27)..(899)

<220>
 <221> misc_signal
 <222> (24)..(30)
 <223> Kozak sequence

<400> 1
 atcactagca acctcaaaca gacacc atg gga ttc ctg gac ggc att gac aag 53
 Met Gly Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys
 1 5

gct cag gag gag cac gag aag tac cac tcg aat tgg cgg gcc atg gcc	101
Ala Gln Glu Glu His Glu Lys Tyr His Ser Asn Trp Arg Ala Met Ala	
10 15 20 25	
tcc gac ttc aac ctg cca ccc gtc gtc gct aag gag atc gtt gct agc	149
Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val Ala Lys Glu Ile Val Ala Ser	
30 35 40	
tgc gac aag tgc cag ctg aaa ggc gag gct atg cac ggg cag gtt gat	197
Cys Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu Ala Met His Gly Gln Val Asp	
45 50 55	
tgc tct ccc ggc atc tgg cag ctc gac tgt act cac ctg gag ggc aag	245
Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Asp Cys Thr His Leu Glu Gly Lys	
60 65 70	
gtc atc ctg gtc gcc gtg cac gtg gcc tct ggt tac atc gag gct gag	293
Val Ile Leu Val Ala Val His Val Ala Ser Gly Tyr Ile Glu Ala Glu	
75 80 85	
gtc atc cct gca gag act ggc cag gag act gcc tat ttc ctg ctg aaa	341
Val Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys	
90 95 100 105	
ctg gcc ggc cgg tgg cct gtg aag aca gtg cac aca gat aac ggc tcc	389
Leu Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys Thr Val His Thr Asp Asn Gly Ser	
110 115 120	
aac ttc acc tcc acc act gtg aag gct gcc tgc tgg tgg gct ggg atc	437
Asn Phe Thr Ser Thr Thr Val Lys Ala Ala Cys Trp Trp Ala Gly Ile	
125 130 135	
aag cag gag ttc ggg atc ccc tat aac cca cag tct cag ggc gtg atc	485
Lys Gln Glu Phe Gly Ile Pro Tyr Asn Pro Gln Ser Gln Gly Val Ile	
140 145 150	
gaa tcc atg aac aag gag ctg aag aag atc atc ggc cag gtt cgg gac	533
Glu Ser Met Asn Lys Glu Leu Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val Arg Asp	
155 160 165	
cag gca gag cac ctg aag act gca gtg cag atg gcc gtg ttc atc cac	581
Gln Ala Glu His Leu Lys Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His	
170 175 180 185	
aac ttc aag cga aag ggc ggc atc ggt ggc tac tca gcc ggc gag cgg	629
Asn Phe Lys Arg Lys Gly Gly Ile Gly Gly Tyr Ser Ala Gly Glu Arg	
190 195 200	

```

atc gtg gac atc atc gcc act gac atc cag acc aaa gag ctg cag aag 677
ile val asp ile ile ala thr asp ile gln thr lys glu leu gln lys
      205                210                215

cag atc acc aag atc cag aac ttc cgt gtg tac tac cgg gac tcc cgg 725
gln ile thr lys ile gln asn phe arg val tyr tyr arg asp ser arg
      220                225                230

gac cct gtg tgg aag ggc cct gcc aag ctg ctg tgg aag ggc gag ggc 773
asp pro val trp lys gly pro ala lys leu leu trp lys gly glu gly
      235                240                245

gcc gtg gtc att cag gac aac tct gac atc aag gtt gtg ccc agg cgc 821
ala val val ile gln asp asn ser asp ile lys val val pro arg arg
      250                255                260                265

aag gcc aag att atc cgg gac tac ggc aag cag atg gct ggc gac gac 869
lys ala lys ile ile arg asp tyr gly lys gln met ala gly asp asp
      270                275                280

tgt gtg gcc tct cgt caa gat gag gac taa gtccaactac taaactgggg 919
cys val ala ser arg gln asp glu asp
      285                290

gatattatga t 930

```

<210> 2

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic gene
expressing HIV integrase

<400> 2

```

Met Gly Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala Gln Glu Glu His Glu Lys
  1                5                10                15
Tyr His Ser Asn Trp Arg Ala Met Ala Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro
      20                25                30
Val Val Ala Lys Glu Ile Val Ala Ser Cys Asp Lys Cys Gln Leu Lys
      35                40                45
Gly Glu Ala Met His Gly Gln Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln
      50                55                60
Leu Asp Cys Thr His Leu Glu Gly Lys Val Ile Leu Val Ala Val His
      65                70                75                80
Val Ala Ser Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val Ile Pro Ala Glu Thr Gly
      85                90                95

```

```

Gln Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp Pro Val
      100              105              110
Lys Thr Val His Thr Asp Asn Gly Ser Asn Phe Thr Ser Thr Thr Val
      115              120              125
Lys Ala Ala Cys Trp Trp Ala Gly Ile Lys Gln Glu Phe Gly Ile Pro
      130              135              140
Tyr Asn Pro Gln Ser Gln Gly Val Ile Glu Ser Met Asn Lys Glu Leu
      145              150              155              160
Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val Arg Asp Gln Ala Glu His Leu Lys Thr
      165              170              175
Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg Lys Gly Gly
      180              185              190
Ile Gly Gly Tyr Ser Ala Gly Glu Arg Ile Val Asp Ile Ile Ala Thr
      195              200              205
Asp Ile Gln Thr Lys Glu Leu Gln Lys Gln Ile Thr Lys Ile Gln Asn
      210              215              220
Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Val Trp Lys Gly Pro
      225              230              235              240
Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Val Ile Gln Asp Asn
      245              250              255
Ser Asp Ile Lys Val Val Pro Arg Arg Lys Ala Lys Ile Ile Arg Asp
      260              265              270
Tyr Gly Lys Gln Met Ala Gly Asp Asp Cys Val Ala Ser Arg Gln Asp
      275              280              285
Glu Asp
      290

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 異なる発現戦略を用いた、293T細胞におけるHIV-1 INの一過性発現のウエスタンブロッティング分析を示す図である。293T細胞をさまざまな発現ベクターによって一過的にトランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後、1%のSDS、1mMのPMSFを用いて細胞抽出物を作成した。総タンパク質量10 μ gを表わす細胞抽出物をPAGEによって分離し、PVDF膜にブロッティングした。HIV-1インテグラーゼに対するポリクローナル抗体およびECL+検出システムを用いて検出を行なった。レーン1は、2.5ngの組替えおよび精製His標識HIV-1インテグラーゼ（HT-IN）を含む。その他のレーンは、等量の以下のプラスミドをトランスフェクションした後の抽出物を含む。レーン2、pCEP4；レーン3、pCEP-IN；レーン4、pCEP-IN-CTE；レーン5、pCEP-IN-RE+pEF-cREV；レーン6、pCMV-IN⁵。

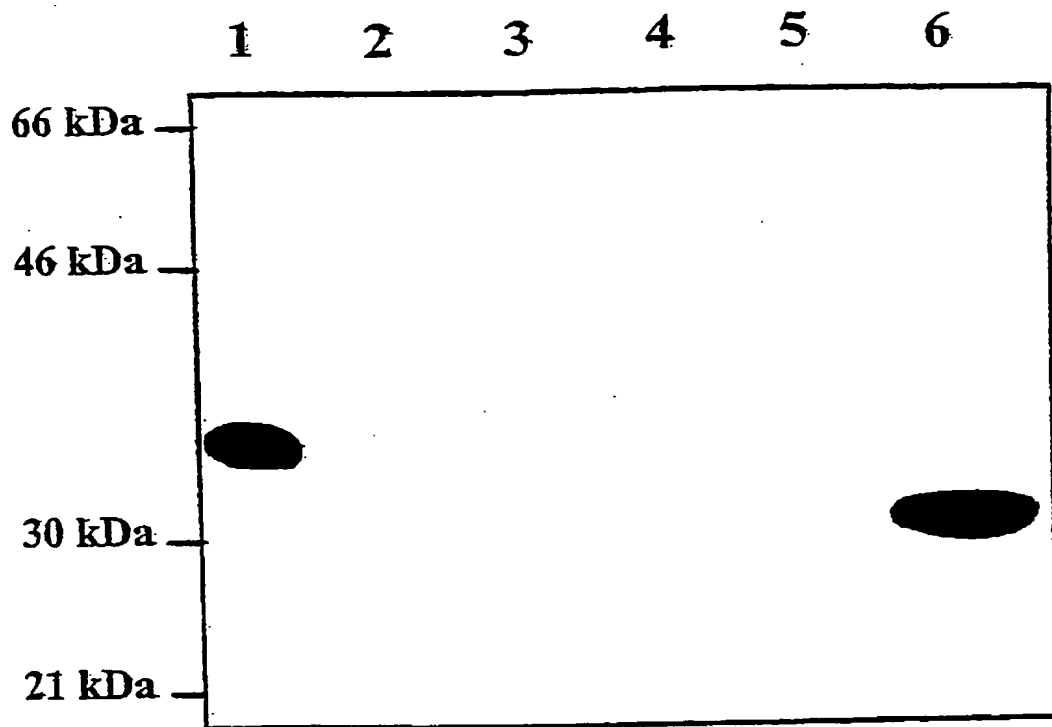
【図2】 合成遺伝子の配列および構造を示す図である。（A）pNL4-3のHIV-1インテグラーゼをコードする合成DNAの配列を示す。アミノ酸

配列を1文字コードで示す。構築に用いた制限酵素切断部位を四角で囲んで示す。翻訳開始部位を下線で示す。(B)合成遺伝子の構造を概略的に示す図である。以下の領域を示す。 β -グロビンmRNA由来の5'および3'非翻訳領域(UTR)、Met-Glyジペプチド、およびインテグラーゼのオープンリーディングフレーム(ORF)。インテグラーゼタンパク質の次の3つのドメインを示す。すなわち、ジンクフィンガーモチーフ(HHCC)、触媒コア、およびDNA結合ドメイン。

【図3】 合成遺伝子からHIV-1 INを安定に発現する293T由来の細胞系のウエスタンブロッティング分析を示す図である。293T細胞をpCMV-IN^sでトランスフェクションし、安定な細胞系をハイグロマイシンBで選択した。細胞抽出物(総タンパク質量10 μ g)をPAGEによって分離し、PVDF膜にブロッティングした。HIV-1インテグラーゼに対するポリクローナル抗体およびECL+検出システムを用いて検出を行なった。レーン1、2、5ngの組替えHis標識HIV-1インテグラーゼ;レーン2、293T細胞の抽出物;レーン3、INを安定に発現する293T細胞(293T-IN^s)の抽出物。

【図4】 プロモータのないレポータ構造を用いたインテグラーゼ活性の検出(DIPR)を示す図である。図4A-Cは、プロモータのないレポータ遺伝子を用いたインテグラーゼ活性の検出方法を概略的に示す図である。

【 図 1 】

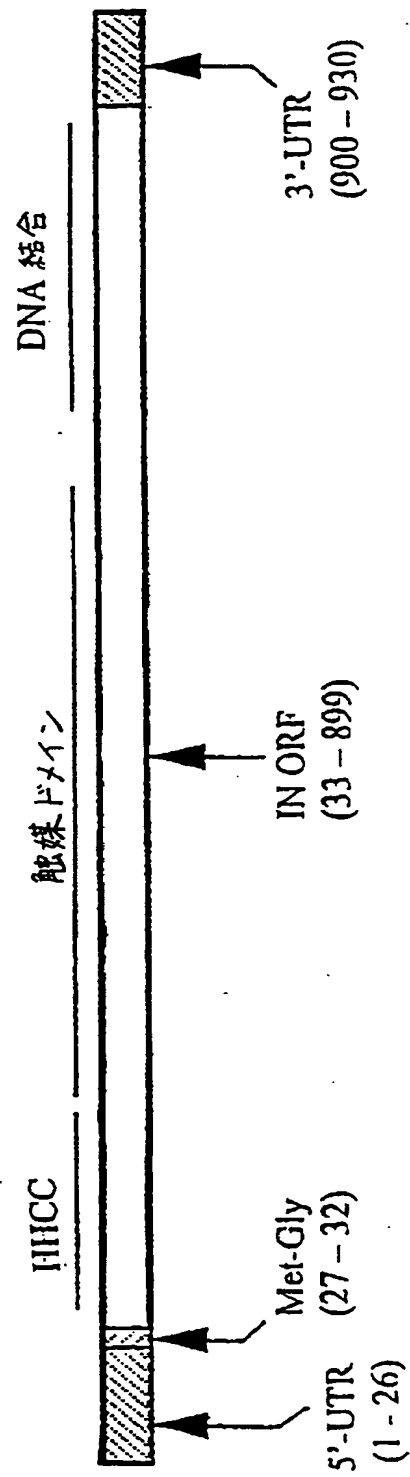


レーン : 1. 2.5 ng HT-IN
2. pCEP-4
3. pCEP-IN
4. pCEP-IN-CTE
5. pCEP-IN-RRE + pEF-cRev
6. pCMV-IN^S

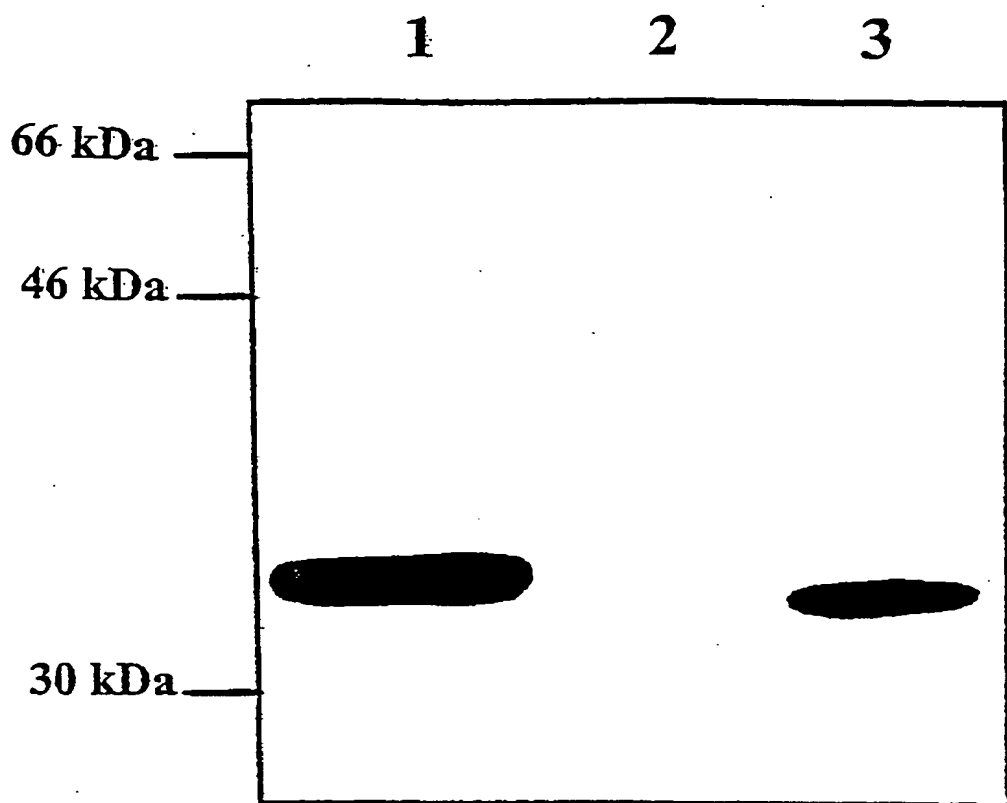
Fig. 2A

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918

【 図 2 B 】



【 図 3 】



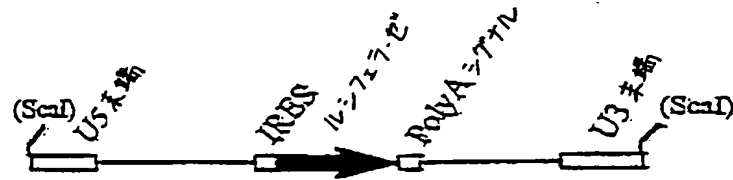
レーン : 1. 2.5 ng HT-IN
2. 293T
3. 293T-IN^S

【 図 4 】

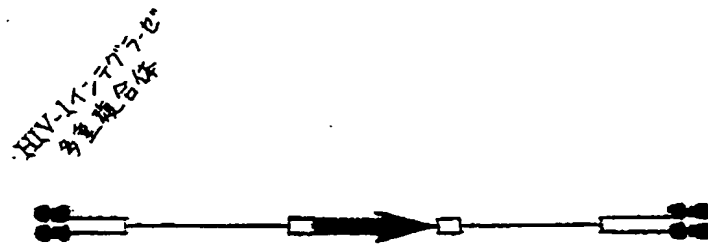
DIPR の原理

プロモータのないレポータ遺伝子を用いたインテグラーゼ活性の検出

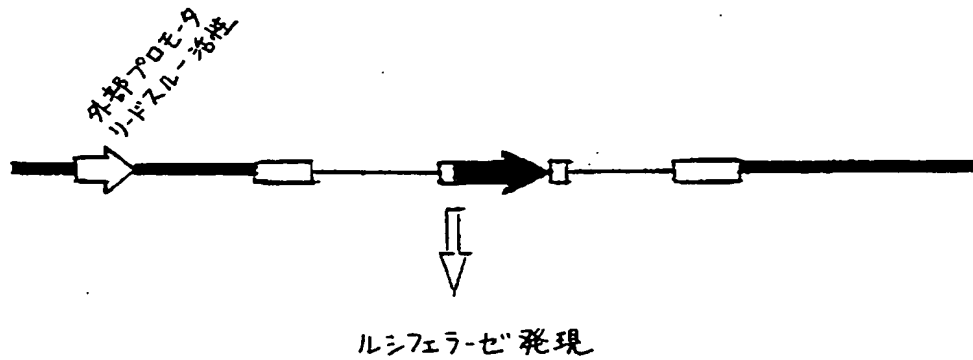
A 基質 LTR-IRES-Luc (ScaI で切断)



B. 細胞へのトランスフェクション、インテグラーゼをU3-U5末端に結合、末端の開裂



C. ゲノムDNAの活性に転写される領域への組み込み



【手続補正書】特許協力条約第 34 条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成 13 年 8 月 9 日 (2001 . 8 . 9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プロモータのないレポータ遺伝子を用いた細胞内インテグラーゼ活性の検出方法。

【請求項 2】 前記インテグラーゼ活性は細胞培養液中に存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記インテグラーゼ活性はインテグラーゼ遺伝子のトランスフェクション後に存在する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記インテグラーゼ活性はインテグラーゼタンパク質によって行なわれる、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】 前記インテグラーゼタンパク質は野生型インテグラーゼ酵素である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記インテグラーゼタンパク質は変異を導入される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 前記インテグラーゼ遺伝子は最適化されたコドン使用頻度を得るために変異を導入される、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 前記インテグラーゼ遺伝子は野生型コドン进行を他のコドンによって置換された部分を有する合成遺伝子である、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 前記インテグラーゼタンパク質はレトロウィルスのものである、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 前記インテグラーゼタンパク質はレンチウィルスのものである、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1】 前記インテグラーゼタンパク質はH I Vインテグラーゼである、請求項 1 0に記載の方法。

【請求項 1 2】 前記レポータ遺伝子はルシフェラーゼ、G F P、および抗生物質選択マーカのうちの1つである、請求項 1 から 1 1のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】 前記レポータ遺伝子は細胞毒性薬剤耐性遺伝子である、請求項 1 から 1 1のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4】 レポータ遺伝子構造はレポータ遺伝子から生成され、前記構造は合成レトロウィルス p o l または g a g 遺伝子から発現される酵素活性を有するレトロウィルスタンパク質の基質として用いられ、合成遺伝子は野生型遺伝子に比べて改善されたコドン使用頻度を有し、前記合成遺伝子は真核細胞中でレトロウィルス p o l もしくは g a g 遺伝子またはレトロウィルス p o l もしくは g a g 遺伝子の領域を発現させるためのものであり、発現されるレトロウィルスタンパク質のレベルは、真核細胞中で発現されるレトロウィルスタンパク質の野生型機能の検出可能な活性を与えるレベルである、請求項 1 から 1 3のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】 前記合成遺伝子は真核細胞中でレンチウィルス p o l もしくは g a g 遺伝子またはレンチウィルス p o l もしくは g a g 遺伝子の領域を発現させるためのものであり、発現されるレンチウィルスタンパク質のレベルは、真核細胞中で発現されるレンチウィルスタンパク質の野生型機能の検出可能な活性を与えるレベルである、請求項 1 4に記載の方法。

【請求項 1 6】 前記合成遺伝子はレトロウィルスもしくはレンチウィルス g a g もしくは p o l 遺伝子またはレトロウィルスもしくはレンチウィルス g a g もしくは p o l 遺伝子の領域を発現させるためのものであり、前記遺伝子またはその領域は、発現される真核生物宿主に対するコドン最適化の後、G Cヌクレオチド対の含有量が53%から63%、より好ましくは55%から61%となり、発現される遺伝子は、真核細胞中で発現されるレトロウィルスまたはレンチウィルスタンパク質の検出可能な酵素活性を与えるレベルで発現される、請求項 1 4または 1 5に記載の方法。

【請求項17】 gagもしくはpol遺伝子またはその領域の発現はレトロウィルス調節タンパク質に依存しない、請求項14から16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】 前記レトロウィルスタンパク質はレンチウィルスgagもしくはpolタンパク質またはそのフラグメントである、請求項14から17のいずれかに記載の方法。

【請求項19】 前記レトロウィルスタンパク質はHIVgagもしくはpolタンパク質またはそのフラグメントである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 酵素機能の検出可能な活性は、宿主細胞DNA、好ましくは宿主細胞の染色体へのDNAフラグメントの組込みの少なくとも促進または刺激を含む、請求項14から19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】 遺伝子の発現のための真核細胞は哺乳動物細胞である、請求項14から20のいずれかに記載の方法。

【請求項22】 発現されるタンパク質は、真核細胞において発現される野生型遺伝子に比べて少なくとも200%の発現レベルを有する、請求項14から21のいずれかに記載の方法。

【請求項23】 図2Aの配列、またはGC含有量が53%から63%、好ましくは55%から61%であるその相同体を含む合成遺伝子を含む、請求項14から21のいずれかに記載の方法。

【請求項24】 レポータ遺伝子構造はレポータ遺伝子から生成され、前記構造は内部IRESを含む、請求項1から23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】 前記レポータ遺伝子は酵素をコードする、請求項1から24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】 インテグラーゼ阻害剤のスクリーニングのための、請求項1から25のいずれかに記載の方法の使用法。

【請求項27】 請求項26に記載の方法によって得られるインテグラーゼ阻害剤。

【請求項28】 合成レトロウィルスpolまたはgag遺伝子に基づくレンチウィルスまたは複合レトロウィルスベクターに対するパッケージング構造で

あって、合成遺伝子は野生型遺伝子に比べて改善されたコドン使用頻度を有し、前記合成遺伝子は真核細胞中でレトロウィルス p o l もしくは g a g 遺伝子またはレトロウィルス p o l もしくは g a g 遺伝子の領域を発現させるためのものであり、発現されるレトロウィルスタンパク質のレベルは、真核細胞中で発現されるレトロウィルスタンパク質の野生型機能の検出可能な活性を与えるレベルである、パッケージング構造。

【請求項 29】 前記合成遺伝子は真核細胞中でレンチウィルス p o l もしくは g a g 遺伝子またはレンチウィルス p o l もしくは g a g 遺伝子の領域を発現させるためのものであり、発現されるレンチウィルスタンパク質のレベルは、真核細胞中で発現されるレンチウィルスタンパク質の野生型機能の検出可能な活性を与えるレベルである、請求項 28 に記載のパッケージング構造。

【請求項 30】 前記合成遺伝子はレトロウィルス g a g もしくは p o l 遺伝子またはレトロウィルス g a g もしくは p o l 遺伝子の領域を発現させるためのパッケージング構造であって、前記遺伝子またはその領域は、発現される真核生物宿主に対するコドン最適化の後、G C ヌクレオチド対の含有量が 53 % から 63 %、より好ましくは 55 % から 61 % となり、発現される遺伝子は、真核細胞中で発現されるレトロウィルスタンパク質の検出可能な酵素活性を与えるレベルで発現される、請求項 28 または 29 に記載のパッケージング構造。

【請求項 31】 g a g もしくは p o l 遺伝子またはその領域の発現はレトロウィルス調節タンパク質に依存しない、請求項 28 から 30 のいずれかに記載のパッケージング構造。

【請求項 32】 前記レトロウィルスタンパク質はレンチウィルス g a g もしくは p o l タンパク質またはそのフラグメントである、請求項 28 から 31 のいずれかに記載のパッケージング構造。

【請求項 33】 前記レトロウィルスタンパク質は H I V g a g もしくは p o l タンパク質またはそのフラグメントである、請求項 32 に記載のパッケージング構造。

【請求項 34】 酵素機能の検出可能な活性は、宿主細胞 D N A、好ましくは宿主細胞の染色体への D N A フラグメントの組み込みの少なくとも促進または刺

激を含む、請求項28から33のいずれかに記載のパッケージング構造。

【請求項35】 レトロウィルスタンパク質はプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼ、またはそのポリタンパク質gag-pol前駆体である、請求項28から34のいずれかに記載のパッケージング構造。

【請求項36】 遺伝子の発現のための真核細胞は哺乳動物細胞である、請求項28から35のいずれかに記載のパッケージング構造。

【請求項37】 発現されるタンパク質は、真核細胞において発現される野生型遺伝子に比べて少なくとも200%の発現レベルを有する、請求項28から36のいずれかに記載のパッケージング構造。

【請求項38】 図2Aの配列、またはGC含有量が53%から63%、好ましくは55%から61%であるその相同体を含む合成遺伝子を含む、請求項28から37のいずれかに記載のパッケージング構造。

【請求項39】 請求項59から61のいずれかに記載の発現ベクターを用いた真核細胞のトランスフェクション法。

【請求項40】 請求項50から58のいずれかに記載の合成遺伝子または遺伝子の領域を保持する真核細胞系。

【請求項41】 レトロウィルスの酵素活性を有するタンパク質が構成的、誘導性または組織特異的プロモータを用いて発現される、請求項40に記載の真核細胞系。

【請求項42】 前記発現は安定である、請求項40または41に記載の真核細胞系。

【請求項43】 請求項50から58のいずれかに記載の合成遺伝子または遺伝子の一部を保持するトランスジェニック動物。

【請求項44】 合成遺伝子または遺伝子の一部の発現は誘導性プロモータまたは組織特異的プロモータによって誘導される、請求項43に記載のトランスジェニック動物。

【請求項45】 哺乳動物を含む、請求項43または44に記載のトランスジェニック動物。

【請求項46】 標的細胞において酵素活性を有するレトロウィルスタ

ンパク質またはこうしたタンパク質の一部をコードする合成遺伝子または遺伝子の一部を調製する方法であって、

1) 標的細胞において容易におよび／または高濃度で自然に発現されるタンパク質をコードする標的真核細胞の遺伝子全体の組からの遺伝子の群を識別するステップと、

2) 前記識別された遺伝子のコドン配列を定め、前記配列から好ましいコドン使用頻度および好ましいヌクレオチド対頻度を定めるステップと、

3) 前記好ましいコドン使用頻度を用いて、酵素活性を有するタンパク質をコードする自然の遺伝子における好ましくないコドンを識別するステップと、

4) 1つまたはそれ以上の好ましくないコドンを、置換されるコドンと同じアミノ酸をコードする1つまたはそれ以上の好ましいコドンによって置換し、前記置換を偏らせて好ましいヌクレオチド対頻度を得るステップとを含み、前記好ましいヌクレオチド対頻度はG Cヌクレオチド対の含有量が53%から63%、より好ましくは55%から61%である、方法。

【請求項47】 前記置換するステップは、乱数発生器を用いて各位置における同じアミノ酸をコードする代替的なコドンからのランダムな選択に基づいて行なわれ、好ましいコドン使用頻度に基づいて代替的なコドンの選択を偏らせることによって好ましいヌクレオチド頻度を得る、請求項46に記載の方法。

【請求項48】 請求項50から58のいずれかに記載の合成遺伝子または遺伝子の領域を発現する真核細胞における遺伝子導入方法。

【請求項49】 前記合成遺伝子は一過的に発現されるか、または前記細胞中に安定に組込まれる、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 真核細胞中でレトロウィルスgagまたはpolタンパク質を発現させるための、合成レトロウィルスgagもしくはpol遺伝子またはレトロウィルスgagもしくはpol遺伝子の領域であって、レトロウィルス遺伝子は真核細胞に適用するときには好ましくないコドンを有し、好ましくないコドンの数は、真核細胞に対する好ましくないコドンのすべてを好ましいコドンによって置換することによってG Cヌクレオチド対の含有量が65%以上になるものであり、合成遺伝子のG Cヌクレオチド対の含有量は53%から63%、より

好ましくは55%から61%であり、発現されるレトロウィルスタンパク質は、真核細胞中で発現されるレトロウィルスタンパク質の検出可能な酵素活性を与えるレベルで発現される、合成遺伝子または遺伝子の領域。

【請求項51】 gagまたはpol遺伝子タンパク質の発現はレトロウィルス調節タンパク質に依存しない、請求項50に記載の合成遺伝子。

【請求項52】 レトロウィルスタンパク質はレンチウィルスgagまたはpolタンパク質である、請求項50または51に記載の合成遺伝子。

【請求項53】 レンチウィルスタンパク質はHIVgagまたはpolタンパク質である、請求項52に記載の合成遺伝子。

【請求項54】 酵素機能の検出可能な活性は、宿主細胞DNA、好ましくは宿主細胞の染色体へのDNAフラグメントの組込みの少なくとも促進または刺激を含む、請求項50から53のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項55】 前記レトロウィルスタンパク質はプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼタンパク質、またはそのポリタンパク質gag-pol前駆体である、請求項54に記載の合成遺伝子。

【請求項56】 前記真核細胞は哺乳動物細胞である、請求項50から55のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項57】 前記タンパク質の発現は、真核細胞における野生型遺伝子による発現の少なくとも200%のレベルである、請求項50から56のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項58】 図2Aの配列、またはGC含有量が53%から63%、好ましくは55%から61%であるその相同体を含む、請求項50から57のいずれかに記載の合成遺伝子。

【請求項59】 請求項50から58のいずれかに記載の合成遺伝子または遺伝子の領域を含む真核生物発現ベクター。

【請求項60】 構成的または誘導性または組織特異的プロモータをさらに含む、請求項59に記載の発現ベクター。

【請求項61】 プラスミド、哺乳動物または昆虫ウィルスを含む、請求項59または60に記載の発現ベクター。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 00/03765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/86 C12N5/10 C12N7/04 C12N15/49 C07K14/16 A61K48/00 C12N15/00 A01K67/027					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, STRAND, BIOSIS, WPI Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	BUSHMAN, F. D. ET AL.: "Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro" SCIENCE, vol. 249, 28 September 1990 (1990-09-28), pages 1555-1558, XP000953086 LANCASTER, PA US page 1556, column 3, paragraphs 2,3 --- -/-				1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
16 January 2001			08.03.2001		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016			Authorized officer Chambonnet, F		

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/03765

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KATZ, R.A. ET AL.: "The avian retroviral IN protein is both necessary and sufficient for integrative recombination in vitro" CELL, vol. 63, 5 October 1990 (1990-10-05), pages 87-95, XP000953087 CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA., US ISSN: 0092-8674 page 88, column 1, line 1 - line 6 page 93	1,2
X	US 5 811 270 A (GRANDGENETT DUANE P) 22 September 1998 (1998-09-22) cited in the application column 1, line 45 -column 2, line 10; claims 1,3	1-3
A	US 5 434 065 A (MAHAN MICHAEL J ET AL) 18 July 1995 (1995-07-18) the whole document	1,2
A	US 5 468 629 A (CALHOUN CORNELIA) 21 November 1995 (1995-11-21) the whole document	1,2
A	WO 98 12207 A (GEN HOSPITAL CORP) 26 March 1998 (1998-03-26) cited in the application	3
X	page 1, line 16 -page 6, line 3; example 1; table 1 page 18, line 1 -page 21, line 4; table 2 page 26, line 11 - line 23; claims 1-14,25-28	4,5
A	HOLLER T P ET AL: "HIV1 INTEGRASE EXPRESSED IN ESCHERICHIA COLI FROM A SYNTHETIC GENE" GENE,NL,ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, vol. 136, 22 December 1993 (1993-12-22), pages 323-328, XP000199775 ISSN: 0378-1119 page 326, column 2, paragraph D	1-3
P,X	CHEREPANOV P, SURRATT D, TOELEN J, PLUYMERS W, GRIFFITH J, DE CLERCQ E, DEBYSER Z.: "Activity of recombinant HIV-1 integrase on mini-HIV DNA." NUCLEIC ACIDS RES. 1999 MAY 15;27(10):2202-10., 15 May 1999 (1999-05-15), XP000877353 the whole document	1-3
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/03765

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 36481 A (CORBEAU PIERRE ;KRAUS GUNTER (US); UNIV CALIFORNIA (US); WONG STAA) 9 October 1997 (1997-10-09) the whole document	1
X	WO 98 34640 A (DAVIES MARY ELLEN M ;PERRY HELEN C (US); FREED DANIEL C (US); LIU) 13 August 1998 (1998-08-13) the whole document	4,5
Y	HAAS J ET AL: "CODON USAGE LIMITATION IN THE EXPRESSION OF HIV-1 ENVELOPE GLYCOPROTEIN" CURRENT BIOLOGY,GB,CURRENT SCIENCE,, vol. 6, no. 3, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 315-324, XP000619599 ISSN: 0960-9822 page 315, column 2, paragraph 2	4,5
X	SCHNEIDER R ET AL: "Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows rev-independent expression of gag and gag/protease and particle formation" JOURNAL OF VIROLOGY,THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY,US, vol. 71, no. 7, July 1997 (1997-07), pages 4892-4903, XP002137891 ISSN: 0022-538X	4
Y	the whole document page 10, last paragraph page 5, paragraph 4 - last paragraph	4,5
P,X	ZUR MEGEDE J, CHEN MC, DOE B, SCHAEFER M, GREER CE, SELBY M, OTTEN GR, BARNETT SW: "Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene." J VIROL 2000 MAR;74(6):2628-35, XP002157414 page 2, paragraph 3 -page 3, paragraph 2 page 5, last paragraph; figure 1 page 10, last paragraph	4,5
T	KOTSPOULOU E. ET AL.: "A REV-INDEPENDENT HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 (HIV-1)-BASED VECTOR THAT EXPLOITS A CODON OPTIMIZED HIV-1 GAG-POL GENE" JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 74, no. 10, May 2000 (2000-05), pages 4839-4852, XP002152133 ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US the whole document	4,5

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/03765

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 39302 A (CHIRON CORP) 6 July 2000 (2000-07-06) page 3, line 15 -page 5, line 10; figures 5,7 page 21, line 30 - line 34; claims 1-11,39,40,53-58; examples 2.1,,2.2.1. -----	4,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/03765

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 3
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 3

Present claim 3 relates to a detection method using as the substrate a product defined in claims 17 to 26. However, present claim 17 (and dependent ones) relates to products defined by reference to a desirable characteristic, namely being expressed at a level to provide detectable activity of the wild-type function of the expressed retroviral protein in the eukaryotic cell.

The claim covers all products having this characteristic, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT).

An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search could only be carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the product wherein, as described in claim 18 and more specifically in the description page 13 line 11 to 14 line 1, a synthetic HIV-1 integrase gene wherein the GC code content would be increased up to 59%.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 65.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/03765

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5811270	A	22-09-1998	NONE	
US 5434065	A	18-07-1995	US 5512452 A US 5571688 A	30-04-1996 05-11-1996
US 5468629	A	21-11-1995	NONE	
WO 9812207	A	26-03-1998	US 6114148 A AU 4355697 A CN 1237977 A CZ 9900968 A EP 0929564 A HU 9904239 A PL 332431 A	05-09-2000 14-04-1998 08-12-1999 15-09-1999 21-07-1999 28-04-2000 13-09-1999
WO 9736481	A	09-10-1997	AU 2721997 A CA 2249349 A EP 0903981 A	22-10-1997 09-10-1997 31-03-1999
WO 9834640	A	13-08-1998	AU 6271198 A CN 1252075 T EP 0969862 A HU 0001347 A NO 993810 A PL 335050 A SK 106699 A	26-08-1998 03-05-2000 12-01-2000 28-08-2000 07-10-1999 27-03-2000 12-06-2000
WO 0039302	A	06-07-2000	AU 2221600 A AU 2487300 A AU 2596600 A WO 0039303 A WO 0039304 A	31-07-2000 31-07-2000 31-07-2000 06-07-2000 06-07-2000

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ドュ・クラーク, エリック

ベルギー、ベロー3360 ロベンジョエル、
バルクラーン、9

(72)発明者 ツェレバノフ, ベーター

ベルギー、ベロー3000 ルーベン、ブリュッセルシュトラート、128

(72)発明者 ブリュイメルス, ビム

ベルギー、ベロー3001 ヘベルリー、ナールセステーンベーク、282

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA07 CA01
DA02 EA02 FA10 GA11 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ21 QR72
QS05 QX01
4B065 AA90X AA97X AA97Y AB01
AC14 BA02 CA24 CA27 CA44
CA46

【要約の続き】

ラーゼである。さらに好ましい実施例において、その酵素はHIV酵素である。より好ましい実施例において、酵素活性を有するタンパク質はHIVインテグラーゼである。この発明はまた、プロモータのないレポータ遺伝子を用いた細胞内インテグラーゼの検出方法を含む。

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**